

分类号:
学 号: 2011107016

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



病毒诱导的基因沉默体系优化及小麦 *SBEIIb* 基因功能的研究

学 位 申 请 人	南富波
指 导 教 师	李卫华 教授
	刘 伟 副教授
申 请 学 位 类 别	农学硕士
专 业 名 称	作物遗传育种
研 究 领 域	作物高产、优质、抗性
	性状的遗传育种
所 在 学 院	农学院

中国·新疆·石河子
2014 年 6 月

分类号：
学 号：2011107016

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



病毒诱导的基因沉默体系优化及小麦 *SBE11b* 基因功能的研究

学 位 申 请 人	南富波
指 导 教 师	李卫华 教 授 刘 伟 副教授
申 请 学 位 类 别	农学硕士
专 业 名 称	作物遗传育种
研 究 领 域	作物高产、优质、抗性 性状的遗传育种
所 在 学 院	农学院

中国·新疆·石河子
2014 年 6 月

**Optimization of Virus Induced Gene Silencing System and Function
Analysis of Wheat(*Triticum aestivum* L.) *SBEIIb***

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agriculture

By

Nan Fu-bo

(Crop Breeding and Genetics)

Dissertation Supervisor: Prof. Li Wei-hua
Associate Prof. Liu Wei

June, 2014

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：南富波

时间：2014年6月6日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：南富波

时间：2014年6月6日

导师签名：李己峰

时间：2014年6月6日

摘要

VIGS (virus induced gene silencing, VIGS) 技术是一种 RNA 介导的植物防御机制, 是指携带目的基因片段的载体病毒进入植物后, 可诱导植物内源基因沉默, 其分子基础可能是转录后基因沉默 PTGS (post-transcript gene silence, PTGS)。VIGS 被视为研究植物基因功能的强有力工具。大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV), 由于其寄主范围广而成为单子叶植物优良的载体, 为小麦基因功能的研究提供了有效的工具。为了给以后利用 VIGS 技术开展小麦淀粉合成酶基因功能的研究提供理论依据和技术指导, 本研究选择小麦 *PDS* (Phytoene Desaturase) 基因与淀粉合成关系较密切的 *SBEIIb* (Starch-branching enzyme IIb) 基因为靶基因, 以 *PDS* 基因为指示基因, 分别构建目的基因片段的 BSMV-VIGS 载体, 接种在小麦叶片和幼穗上, 在不同温度条件、接种方法、接种量的处理下, 诱发植物发生基因沉默, 并对其定性定量分析, 建立小麦穗部相对最优的 VIGS 体系, 并利用该体系进行了 *SBEIIb* 基因功能的初步研究, 主要研究结果如下:

1、克隆了小麦 *PDS* 基因片段和 *SBEIIb* 基因片段, 并构建其 VIGS 重组载体。

2、选择注射法和摩擦法分别侵染抽穗期的小麦穗部, 结果发现, 采用两种方法接种的植株均在 5-8 dpi (days post infection) 出现明显的光漂白现象, 在 15 dpi 光漂白现象明显扩大, 在 23-26 dpi 光漂白程度最大。采用注射法接种的侵染成功率只有 20%, 而摩擦法接种的侵染成功率为 90%。接种旗叶的表型变化与接种穗部的相似。由于基因沉默延迟, 在接种旗叶 20 dpi 左右, 穗部才观察到光漂白现象。采用摩擦法接种小麦幼穗后, 放在 21-24℃ 和 26-29℃ 的不同温度下培养。结果发现, 在两个环境中培养的植株病毒侵染成功率均在 90% 左右。在 26-29℃ 较高温度下, 病毒发展过快, 症状过重, 掩盖了基因沉默的光漂白表型, 并且发生了其他的严重病害, 影响了接种材料表型观察及分子检测。此外, 在 26-29℃ 环境下的植株还表现出灌浆不充分和不能结实的现象。接种次数对 VIGS 诱导基因沉默的影响只是提高了接种成功率, 其他并无明显变化。因此, 选择摩擦法接种小麦穗部, 在 21-24℃ 培养更优。

3、选取出现光漂白植株的小穗及相应时期的对照组进行色素含量测定及 *PDS* 基因相对表达量的测定。结果显示, 叶绿素 a 及类胡萝卜素的含量均在 20 dpi 分别下降 83.6% 和 91.4%。叶绿素 b 的含量在 12-20 dpi 减少超过 60%。在 20 dpi 前后, 叶绿素总含量减少 80.5%。在接种后 3 d *PDS* 基因相对表达量下降了 50% 左右, 在第 9-20 dpi, 维持在一个相对较低的水平 (约 10%), 在 25 dpi 之后有所上升。说明叶绿素含量的降低是由 *PDS* 基因沉默引起的。

4、在小麦抽穗期, 将携带 *SBE IIb* 的 BSMV 侵染小麦, 在接种后第 6, 9, 12, 15 和 20 d 分别提取总 RNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示, 与对照相比, *SBE IIb* 基因相对表达量在 6 dpi 出现明显下降, 其含量仅为对照组的 49%, 到 12 dpi 相应值下降为 43.8%, 到 20 dpi *SBE IIb* 基因的相对表达量仅为对照组的 5% 左右。直链淀粉和抗性淀粉含量测定的结果表明, 籽粒直链淀粉含量增加了 10.21%, 抗性淀粉含量增加了

11.45 %。说明 *SBE IIb* 基因被有效的沉默了，且该载体所沉默的基因引起了小麦直链淀粉的变化，但均没有达到显著水平。

关键词：VIGS，小麦，PDS，SBEIIb，直链淀粉，抗性淀粉

Abstract

VIGS technology is a kind of plant defense mechanisms mediated by RNA, which may be the molecular basis of post-transcriptional gene silencing. When the vectors carrying the gene fragment into the plant, it can induce endogenous gene silencing. VIGS is regarded as a powerful tool for studying gene function. Since Barley stripe mosaic virus has a wide host range, it provides an effective tool for studying genes function in wheat. In order to carry out a theoretical basis and technical guidance for gene function study in wheat by VIGS. We constructed BSMV vector with *PDS* gene to explore ways of inoculation, vaccination site, effects of temperature and inoculum culture of BSMV-VIGS system. Eventually we established a relatively optimal system. And the system was used to study *SBEIIb* gene's function. The main results are as follows:

1. Wheat *PDS* gene fragment and *SBEIIb* fragment was cloned by PCR. We constructed the VIGS recombinant vectors.

2. Spikes were inoculated by injection and rubbing at heading stage. The results showed that photo bleaching appeared at 5-8 dpi, distinct at 15dpi, and reached its highest intensity at 23-26 dpi. Only 20% plant was infected successfully by injection. But that rate was 90% by rubbing. The phenotypic changes in flag leaves which were inoculated by rubbing were quite similar with that in spikes. Photo-bleaching was observed on spikes about 20 dpi of flag leaf because of migrate of the gene silencing. Wheat flag leaves were inoculated by rubbing at heading stage and placed under 21-24 °C and 26-29 °C. The results showed that around 90% of them were infected successly. At higher temperatures, the virus developed too fast which made too heavy symptoms to find photobleaching phenotypes. And the plants also got other serious diseases. That affects the observation and molecular detection of gene silencing. Therefore, the higher temperatures are not conducive to the implementation of the VIGS on wheat. In addition, according to the tolerance range of plants, inoculation times only induced the success rate of gene silencing to nearly 100%. So the better way is rubbing the spikes at 21-24 °C

3. Determination of pigment content and the qRT-PCR analysis showed that 83.6% and 91.4% decrease was in Chlorophyll a and carotenoids at 20 dpi. The content of Chlorophyll b was less than 40% in 12 dpi-20 dpi. Total chlorophyll abundance was less than 20% around 20 dpi. 50% decrease in the transcript content of the *PDS* gene was observed at 3 dpi of spikes. The *PDS* transcript level was always around 10% between 9 dpi and 20 dpi. *PDS* transcript level was suppressed until 25 dpi. So the chlorophyll content decreased caused by the silencing of *PDS* gene.

4. We infected the wheat with BSMV which carrying *SBE IIb* at heading atage, and extracted total RNA of 6 dpi, 9 dpi, 12 dpi, 15 dpi, 20 dpi. qRT-PCR results showed that *SBE IIb* gene transcript level was increased at 6 dpi. Its content was only 49%. The ratio was dropped to 43.8% and 5% at 12 dpi and 20dpi. The proportion of amylose was increased by 10.45% and the proportion of resistant starch was increased by 11.45%. So the vectors silenced the *SBE IIb* gene and caused changes in starch. But they showed no significant difference.

Keywords: VIGS, Wheat, SBE II b, Amylose, Resistant Starch

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩略词表.....	V
前 言.....	1
第一章 文献综述.....	2
1.1 小麦籽粒淀粉组分.....	2
1.1.1 直链淀粉.....	2
1.1.2 支链淀粉.....	2
1.2 淀粉合成同工酶及其与淀粉的关系.....	3
1.3 抗性淀粉研究进展.....	7
1.4 植物基因功能研究方法.....	8
1.4.1 RNAi 的概述.....	8
1.4.2 VIGS 的建立与发展.....	9
1.4.3 VIGS 机制.....	9
1.4.4 VIGS 影响因素.....	10
1.4.5 VIGS 研究进展及其在小麦中的应用.....	11
1.5 本研究的目的与意义.....	13
第二章 材料与方法.....	14
2.1 试验材料、试剂及仪器.....	14
2.1.1 试验材料.....	14
2.1.2 试验试剂.....	14
2.1.3 试验仪器.....	14
2.2 试验方法.....	14
2.2.1 小麦籽粒总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成.....	14
2.2.2 小麦各目的基因的克隆和测序.....	14
2.2.3 VIGS 重组载体的构建.....	15
2.2.4 VIGS 载体的线性化及纯化.....	16
2.2.5 体外转录.....	16
2.2.6 接种.....	17
2.2.7 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR) 检测.....	17
2.2.8 小麦籽粒直链淀粉和抗性淀粉含量的测定.....	18
2.2.9 叶绿素含量的测定.....	18
2.3 数据统计分析.....	18
第三章 结果与分析.....	19
3.1 小麦穗部实施 VIGS 体系的优化.....	19
3.1.1 小麦籽粒总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成.....	19
3.1.2 小麦 <i>PDS</i> 基因的克隆和测序.....	19
3.1.3 VIGS 重组载体的构建.....	20
3.1.4 VIGS 载体的线性化.....	20
3.1.5 体外转录.....	21
3.1.6 接种试验.....	21
3.2 在小麦穗中诱导 <i>SBE IIb</i> 基因沉默的研究.....	25
3.2.1 小麦 <i>SBE IIb</i> 基因的克隆和测序.....	25
3.2.2 VIGS 重组载体的构建.....	26
3.2.3 VIGS 载体的线性化与体外转录.....	26
3.2.4 <i>SBE IIb</i> 基因相对表达量的检测.....	27

3.2.5 直链淀粉和抗性淀粉含量的测定	27
第四章 讨论与结论	29
4.1 影响 BSMV-VIGS 的因素	29
4.1.1 寄主因素	29
4.1.2 载体因素	30
4.1.3 人为因素	31
4.2 BSMV-VIGS 诱导 <i>SBE IIb</i> 基因沉默	32
4.3 BSMV-VIGS 应用展望	32
4.4 结论	32
参考文献	34
致 谢	42

缩略词表

缩写	英文全称	中文名称
ADP-G	Adenosine diphosphate glucose	腺苷二磷酸葡萄糖
AMP	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
BSMV	Barley Stripe Mosaic Virus	大麦条纹花叶病毒
DBE	Starch-debranching enzyme	淀粉去分支酶
DEPC	Diethyl Oxydiformate	焦碳酸二乙酯
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate	脱氧核苷酸磷酸
dpi	Days post infection	接种后天数
dsRNA	Double-Strand RNA	双链RNA
EST	Expressed Sequence Tags	表达序列标签
GBSS	Granule Bound Starch Synthase	颗粒结合淀粉合成酶
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷
MSV	Maize Streak Virus	玉米条纹病毒
NaAC	Sodium acetate	醋酸钠
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国立生物技术信息中心
OD	Optical Density	光密度值
<i>PDS</i>	Phytoene Desaturase	八氢番茄红素脱氢酶
PTGS	Post Transcriptional Gene Silencing	转录后基因沉默
PVX	Potato Virus X	马铃薯病毒X
RdRP	RNA-Directed RNA Polymerase	RNA引导的RNA聚合酶
RISC	RNA Induced Silencing Complex	RNA诱导基因沉默复合物
RNAi	RNA Interference	RNA干扰
RS	Resistant Starch	抗性淀粉
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	反转录聚合酶链式反应
SBE	Starch-branching enzyme	淀粉分支酶
siRNA	Short Interfering RNA	小干扰RNA
SS	Starch synthase	淀粉合成酶
TMV	Tobacco Mosaic Virus	烟草花叶病毒
VIGS	Virus Induced Gene Silencing	病毒诱导基因沉默
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

前言

小麦是世界上重要的农作物，是我国第三大粮食作物，也是中国中部与北方地区最喜爱的食品作物。近年来我国优质小麦的消费数量呈现出加速增长态势，因此发展优质小麦是适应国内市场需求的需要。小麦穗部作为小麦的主要功能器官，穗部功能基因的研究对于小麦品质性状的遗传改良具有重大的意义。小麦淀粉由直链淀粉和支链淀粉两种葡萄糖多聚体组成。直链淀粉与支链淀粉的比例（直/支比）影响淀粉的理化性质，进而影响小麦的加工品质、食用品质和工业用途(赵法茂，2008)。其中，近年来开始研究的抗性淀粉越来越引起人们的研究兴趣，成为研究淀粉品质的一个热点。

抗性淀粉(Resistant starch, RS)是一种新型的淀粉产品。在生产中，抗性淀粉的含量提高可以通过提高淀粉中直链淀粉/支链淀粉比例实现。抗性淀粉具有提供能量，保护肠道(Coudray C, 2003)、减少淀粉热效应(Heijnen MLA, 1995)，防止糖尿病的发生和调节脂肪积累(Sajilata MG, 2005)以及调节钙、锌、镁等多种离子的吸收(王竹，2002)等作用。研究发现，小麦淀粉中的支、直链淀粉的合成是受淀粉合成酶(Starch synthase, SS、Granule Bound Starch Synthase, GBSS)、淀粉分支酶(Starch-branching enzyme, SBE)、淀粉去分支酶(Starch-debranching enzyme, DBE)等多种酶的调节控制。

VIGS 技术是一种 RNA 介导的植物防御机制，是指携带目的基因片段的载体病毒进入植物后，可诱导植物内源基因沉默，进而研究目标基因的功能，其分子基础可能是转录后基因沉默。与其它研究基因功能的方法(如基因突变、反义抑制等)相比，VIGS 技术具有研究周期短、可在不同的遗传背景下生效、不需要遗传转化以及能在不同的物种间进行基因功能的快速比较等优点(Burch-Smith 等，2004；王宏芝等，2005)，而且具有高通量等特性。因此，VIGS 一经建立，即被视为研究植物基因功能的强有力工具，得到了深入的研究和广泛应用，已用于烟草、番茄、小麦等多种植物的抗逆基因、生长发育以及代谢调控的功能基因研究。大麦条纹花叶病毒(Lacomme 等，2003)，由于其寄主范围广(McKinney 等，1965)而成为单子叶植物优良的载体(Holzberg 等，2002)，为水稻和小麦等重要单子叶作物基因功能的研究提供了有效的工具，使利用 VIGS 技术诱导单子叶植物基因沉默，研究基因功能具有可行性。而基于小麦淀粉基因进行 VIGS 体系优化的研究还有待进一步深入。

淀粉的生物合成过程复杂，研究各淀粉合成基因的功能对于育种工作是十分有意义的。研究发现淀粉生物合成相关酶基因的抑制与表达会影响淀粉品质。高直链淀粉突变体($\geq 50\%$)是由于 *SSIIa* 和 *SBEII* 两种基因的失活引起的(Rahman 等，2007)。本研究选择以大麦条纹花叶病毒(BSMV)为载体，插入目的基因片段，应用 VIGS 抑制八氢番茄红素脱氢酶基因，该基因沉默会使植株产生明显的光漂白表型而常作为 VIGS 体系的指示基因，分别从表观水平、分子水平等分析该体系在不同条件下基因沉默的效果，提出优化方案，然后利用该优化方案研究与淀粉合成关系密切的 *SBEIIb* 基因的功能，为以后在小麦上实施 VIGS、改良淀粉品质提供理论依据和技术指导。

第一章 文献综述

1.1 小麦籽粒淀粉组分

小麦籽粒，在植物学上其果实为颖果，它是果皮和种皮融合而成的。小麦籽粒中积累了大量的储存混合物，主要是淀粉和蛋白质。淀粉约占小麦籽粒重量的 65% 左右，淀粉的储存形式是碳水化合物，为人类提供的能量约占 75%。淀粉的多聚体形式主要包括两类葡萄糖分子：直链淀粉和支链淀粉，它们各占淀粉的 1/4 和 3/4。支链淀粉和直链淀粉都是由 α -1, 4 葡萄糖残基的骨架构成。支链淀粉的聚合度 (DP) 在 5000-50000 之间，分支较多 (α -1, 6 分支点约 3%-4%)，分子量较大；直链淀粉的聚合度在 1000-5000 之间，分支点少 (α -1, 6 分支点不足 0.5%)。直链淀粉和支链淀粉的合成底物都是 ADP-葡萄糖，但途径却不同。GBSS I 与直链淀粉的合成有关，然而支链淀粉的合成涉及到淀粉合成酶 (SS I、SS II、SS III)，淀粉分支酶 (SBE I、SBE II a、SBE II b) 和淀粉去分支酶中的异淀粉酶以及极限糊精酶 (ISA 和 LD) 等 (Ball 等, 2003; 王自布等, 2012)。

1.1.1 直链淀粉

直链淀粉也称为可溶性淀粉，它是葡萄糖经糖苷键相互连接形成的线形聚合物。直链淀粉是由 α -1, 4 糖苷键连接起来的 D-葡萄糖基多糖链，空间构象卷曲成螺旋状。直链淀粉的一级结构简单导致其形成的二级结构规则。淀粉的 α -1, 4 糖苷键由两个羟基脱水缩合而来。由于存在 α -1, 4 键，各相邻的残基和基团可以保持一定的角度，形成每环 6 个葡萄糖基的螺旋结构，又由于其他的分子间作用力的作用使得这种螺旋结构更加稳定。淀粉与碘的反应就是这种稳定结构的典型例子。直链淀粉与碘的复合物成深蓝色，从而可以很容易定性标识淀粉。

各直链淀粉分子之间存在着相互吸引的极性基，它们通过氢键来相互作用，因此，直链淀粉的某些优势是其他淀粉没有的，如，能与碘更好地结合，高糊化温度，较好的抗润胀性等。直链淀粉易溶解于热水中以形成胶体溶液，并且可以快速地消化，被人体吸收。直链淀粉被认为是以非晶体的形式合成的。

1.1.2 支链淀粉

也被称为胶淀粉的支链淀粉，微溶于冷水，与热水作用则膨胀而成糊状，遇碘呈紫或红紫色。支链淀粉分子具有单一的还原性末端，但有许多非还原性末端。支链淀粉和直链淀粉不同，其连接葡萄糖分子的键除 α -1, 4-糖苷键外，还有 α -1, 6-糖苷键。支链淀粉具有分支点，每隔 20 个葡萄糖残基通常就会具有分支点，其分支的链约占整个支链淀粉的 5%。

在结构方面，支链淀粉以 D-吡喃葡萄糖为基本单位，以 α -1, 4-糖苷键连接形成的直链称为 A 链，以 α -1, 6-糖苷键为分支点形成的侧链称为 B 链，在 B 链上以 α -1, 6-糖苷键为分支点形成的侧链称为 C 链。A 链上每隔 6-9 个单位就会有一个分支点，因此支链淀粉是一种高度支链化的复杂聚合物。

不同 SSs 亚型的淀粉合成酶相互作用，完成淀粉的合成并影响淀粉粒的结构 (Ball

等, 2003; Tetlow, 2006)。一些基因组学, 生物化学以及体外研究表明: SS I 负责短链的延伸, SS II 是媒介物, SSIII和 GBSS I 可能负责延长支链淀粉的长链, 只有在合成直链淀粉的时候需要 GBSS I。SSIV主要是在淀粉粒形成的初期发生作用; 但是同时有许多研究表明, 不排除 SS 转基因和突变系在亚型的功能上有叠加性。SS II 特异性地负责延伸短链, 形成支链淀粉中的簇, 而其他亚型无此功能。然而 SS II 活性的降低在马铃薯的微管中对淀粉合成的影响并不明显 (Edwards 等, 1995)。SS IIa 编码淀粉粒束缚态蛋白-1 (SGP-1 蛋白) (Li 等, 1999)。Yamamori (Yamamori 等, 2000) 的报道中, 小麦籽粒蛋白 1 (SGP-1) 缺乏株系都缺乏来自小麦的三个基因组 A, B, D 的三种 SS II a 淀粉酶活性。这些株系中都存在颗粒的形态学和结晶度变化, 直链淀粉含量升高 (31%-37%), 支链淀粉链中聚合度 11-25 比例降低, 聚合度 6-10 比例增加。其中直链淀粉含量的提高是一个非常有意义的发现, 因为这样就提高了抗性淀粉的含量, 将有益于人类肠胃的健康 (Topping 等, 2001; Bird 等, 2004; Regina 等, 2006)。SSIII活性的降低致使 80% 的可溶性酶活性降低, 并导致淀粉粒出现裂缝, 但是其影响并不像 RUG5 突变那样对支链淀粉的结构产生影响 (Marshall 等, 1996)。这可能说明了淀粉合成酶各亚型在支链淀粉的合成过程中的贡献可能有质和量的不同。

有研究表明 GBSS I 可能同时涉及到直、支链淀粉的合成。缺乏 GBSS I 的某些突变体与野生型相比, 支链淀粉不同 (Flipse 等, 1996)。Chlamydomonas 株系 STA2 位点突变导致淀粉合成酶的束缚态亚基异常, 导致其丢失部分长链支链淀粉, 因为此亚基负责直链淀粉合成 (Delrue 等, 1992)。其次, GBSS I 只在质体内负责对支链淀粉进行延伸。一直以来, 糯小麦的发展主要是由于改变束缚态淀粉合成酶而来的 (Nakamura 等, 1995), 同时也发展了各种各样的关于 GBSS 表达量对小麦特性的影响的课题 (Zhao 等, 1998)。

1.2 淀粉合成同工酶及其与淀粉的关系

小麦叶片通过卡尔文循环固定 CO₂, 在造粉体中进行淀粉的合成。淀粉的合成需要一系列酶的催化作用 (Smith 等, 1993), 由淀粉分支酶 (SBE)、可溶性淀粉合成酶 (SSS)、淀粉去分支酶 (DBE) 和颗粒结合型淀粉合成酶 (GBSS) 负责直、支链淀粉的合成 (Ball 等, 1996; Preiss 等, 1996)。其中它们又分别有不同作用的同功类型。小麦淀粉中直、支链淀粉的比例及支链淀粉的特性决定了淀粉粒的结构、质量和功能等。直链淀粉的合成与颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS) 有关; 支链淀粉的合成过程复杂, 由多种酶共同控制合成 (Ball, 2003)。

淀粉的生物合成是一个复杂的过程, 支链淀粉的合成尤其复杂。淀粉合成酶的主要形式: 颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS) 和可溶性淀粉合成酶 (SSS)。SSS 是支链淀粉合成过程中的关键酶, 在小麦籽粒的淀粉粒中以游离状态存在, 催化淀粉引物与 ADPG 的反应 (Alan, 等, 2000)。GBSS 在淀粉粒内部以束缚状态存在, 是直链淀粉合成过程中的关键酶, 参与 ADPG 上的葡萄糖到淀粉引物的转移 (Denyer 等, 2001; Alan 等, 2000)。研究已经表明, 有两种 GBSS 同工酶, GBSSI 即调控 Waxy 蛋白, 决定胚

乳中直链淀粉含量；在小麦中，GBSSII 调控非贮存淀粉中直链淀粉的合成。在小麦中目前已发现的 SS 酶有三种。SSI 只存在于胚乳中(Ryoo 等, 2007; Rahman 等, 2001)。SSII 又称 Sgp-1 蛋白, 在小麦胚乳、叶片及小花中都有存在 (Damager 等, 2003)。而 *ss3* 基因编码的 SSIII, 早期就在胚乳中以可溶性状态存在, 可能参与支链淀粉短链的合成 (Li 等, 2000)。SBE 在支链淀粉形成过程中非常重要, 两种异构体: SBEI 和 SBEII。SBE II 又包含两个同工酶: SBE II a 和 SBE II b。它们负责形成分枝, 断开葡聚糖链中的 α -1, 4 糖苷键, 并引入 α -1, 6 糖苷键。淀粉合成中, 胚乳发育后期 SBEI 很重要 (Rahman, 2001)。目前 SBEI 和 SBEII 在淀粉合成中的作用仍然有待进一步解答。(Repellin 等, 2008)。已发现淀粉分支酶 (DBE) 在淀粉合成也具有重要的作用。当糖链延长至一定长度, 淀粉分支酶的作用是切开淀粉链到合适的长度, 使之作为底物为淀粉合成酶用于延伸新的淀粉链 (Repellin 等, 2008)。

淀粉合成酶负责将腺苷二磷酸葡萄糖残基转移到 α -1, 4 葡萄糖残基的非还原性末端, 完成聚合反应。颗粒束缚态淀粉合成酶 (GBSS) 是直链淀粉合成的时候需要的酶, 而且发现这种酶几乎完全存在于基质颗粒中; 可溶性淀粉合成酶 (SS), 包含整个 SS 基因家族。有研究表明, 有五类淀粉合成酶基因: GBSS, SS I, SS II, SSIII, 和 SSIV (Li 等, 1999a, 1999b, 2000)。

最早 Leloir 等 (Leloir 等, 1961) 发现直链淀粉的合成主要由颗粒束缚态淀粉合成酶 (GBSS I 或 GBSS) 完成。缺乏 GBSS 蛋白或者是缺乏具有修饰的酶活性的玉米产生不含直链淀粉的突变体。在突变体的研究中发现缺陷基因产生 GBSS 蛋白。存在于支链淀粉部分的 GBSS I 在体内和体外都负责长葡萄糖链的延伸 (Delrue 等, 1992)。插入反义载体的腺苷二磷酸焦磷酸酶或者是突变体的葡萄糖磷酸变位酶含很低或没有直链淀粉, 这一事实进一步表明了 GBSS I 有很高的特异性活性 (Van den Koornhuysse 等, 1996)。有研究表明 (Fulton 等, 2002), GBSS I 参与半晶体多聚糖的构建。这种不规则非晶体呈颗粒状, 通常在高直链淀粉突变体中可以找到 (Bul on 等, 1997)。另外, 有许多证据显示基因组中还存在着分别在胚乳中表达和在其他组织中表达的两类 GBSS 基因, 并且有各自重要的基因功能 (Edwards 等, 2002; Fujita 等, 1998; Vrinten 等, 2000)。

淀粉生物合成中 SS I 的功能研究比较少。该酶要么对于淀粉合成的贡献很大, 突变体是致命的, 要么贡献非常小, 以至于种子性状或籽粒外表看不到突变。与其他淀粉合成酶相比较来说, SS I 的活性在发育的谷物胚乳中较高, 在胚乳中 SS I 酶在颗粒和基质中都有存在 (Li 等, 1999a)。

SS II 基因突变或反义抑制产生的结果是支链淀粉含量的增加 (Craig 等, 1998), 且在马铃薯中糊化温度和粘度有稍微的降低 (Edwards 等, 1999)。*SS II* 基因家族在单子叶植物中分为两类: *SS IIa* 和 *SS IIb*。*SS IIb* 的功能在胚乳淀粉生物合成中还不是很清楚, 这可能是由于基因的复制引起的 (Harn 等, 1998)。在水稻和小麦中发现了 *SS IIa* 活性缺乏的株系 (Umemoto 等, 2002)。小麦突变体中 (Yamamori 等, 2000), 突变

株系淀粉的含量有所下降而且淀粉的结构有所改变。SS II a (单子叶植物) 活性的缺失改变了支链淀粉链长度分布, 降低了结晶度。水稻的 SS II 包含三种酶(Hirose 等, 2004), 且谷物中 SS 基因的亚型丰富(Fujita, 2006)。小麦籽粒 SS II 的主要以 SS II a 的形式存在(Li 等, 2003)。

SSIII主要存在于基质外。玉米中活性降低的突变体(dul)(Gao 等, 1998)以及绿藻中(sta3)(Fontaine 等, 1993), 马铃薯中反义抑制的SSIII(Edwards 等, 1999)都已经报道。反义抑制的两个研究中支链淀粉的合成受到了严重的影响, 改变了链长在支链淀粉中的分布。玉米中 dull 表型引起了微弱的表型变化。

SSIV也是存在于基质外的一种淀粉合成酶。拟南芥, 豇豆, 小麦以及绿藻的SSIV(也被称为SSV)序列片段在EST数据库中已经可以查到。然而, 缺乏株系的相关蛋白质识别的遗传证据。但是当SSIV酶类活性减弱时, 酶的功能互补能力会消失, 结果有许多受损的表型产生。

目前, 在许多物种中都有对积累水溶性多糖(WSPs)的低淀粉突变体的报道, 如大麦, 水稻, 拟南芥, 玉米及藻类等(Zeeman 等, 1998)。在他们中几乎都存在糖原积累的增加。植物中可溶性多糖常被称为聚合物, 因为在植物体内一般都不会有糖原。在高等植物中的淀粉去分支酶(DBE)活性缺失的程度与一些特殊的基因突变有关(Dinges 等, 2001)。植物中存在两个分支酶类型: 也称为限制糊精酶的支链淀粉酶(PUL)和异淀粉酶(ISO)(Doehlert 等, 1991)。PUL能够高效地将支链淀粉的分支剪切掉。异淀粉酶(ISO)可以将糖原和支链淀粉剪切消化掉。这两种酶都是不需要 α -1, 4葡萄糖转移酶而直接能够水解 α -1, 6糖苷键的酶, 因此它们都是淀粉去分支酶。

1995年James等(James 等, 1995)报道发现甜玉米, 1998年(Rahman 等, 1998)发现了一种特殊的ISO突变体。如今, 水稻和玉米的PUL活性减弱的研究已经不足为奇(Beatty 等, 1999), 但衣藻和拟南芥中PUL的突变却鲜有报道。在其他类似的谷物突变株系中, 往往能检测出蔗糖含量高。Shr-2突变体的PUL酶活性的缺失是由于ADPPase活性缺失导致的。在谷物中, ISO活性的缺失导致糖原的累积。据Nakamura(Nakamura 等, 1997)和Kubo(Kubo 等, 1999)研究发现, 在水稻和中玉米, PUL控制着淀粉表型的变异。

目前大家越来越清楚地认识到去分支酶在淀粉合成中尤其是支链淀粉的合成中扮演着重要的角色。DBE可以看做是淀粉水解酶家族的成员, 它的氨基酸序列与 α -淀粉酶很相近, 它主要参与水解 α -1, 6糖苷键。近来科研人员发现, 支链淀粉的分支形成是淀粉分支酶和淀粉去分支酶两种酶相互协作完成的。Nakamura等(Nakamura 等, 1996)认为糖原是DBE活性减低或丧失的产物, 是SBE单独作用或主导的结果。后来, Ball等发表了DBE修剪模型(Ball 等, 1996): SSS, SBE, DBE三种酶共同作用完成支链淀粉的合成。SSS负责延伸短糖链, 当糖链延伸到一定程度之后, SBE在适当位置切开 α -1, 4糖苷键并将短链以 α -1, 6糖苷键的形式连接上, DBE负责清除位置不对的 α -1, 6糖苷键, 防止过多分支的产生。当上述分支出来的分支链产生后, SSS继续对其作用,

延伸, 如此往复 (Ball 等, 1996)。只是现在对 DBE 的所有亚型是否都是按着这个模型工作现在还不是很清楚。

Zeeman 等 (Zeeman 等, 1998) 发表猜想: DBE 可能只是去减少那些与颗粒淀粉合成有关的非颗粒状的 α -葡萄糖, 并没有直接参加支链淀粉的合成。葡萄糖修剪复合型假说常用于阐释为何糖原和淀粉在许多去分支酶突变体中并存 (Zeeman 等, 1998)。后来 Myers 等 (Myers 等, 2000) 在 Ball (Ball 等, 1996) 的模型基础上进行了总结, 提出了复合型假说。他认为: 淀粉去分支酶的主要作用是修剪整理不规则的淀粉分支, 并对其结构进行调整, 最后产生排列规则的薄晶体。因此这两种假说认为, 由于突变体中缺乏 DBE 活性, 造成突变体株系中同时存在糖原和淀粉。目前, 想要彻底弄清楚 DBE 在淀粉合成过程中的功能还需要更多的证据。

通过大范围物种的分支酶序列比对可以看出, 植物中有两类分支酶, 分支酶 I (SBE I; 也称为 SBE B) 和分支酶 II (SBE II; 也称为 SBE A)。单子叶植物中, 淀粉分支酶 II 类 (SBE II) 指的是 SBE II a 和 SBE II b。在玉米、水稻和豌豆中, 抑制 SBE II b 导致直链淀粉含量的增加 (Bhattacharyya 等, 1990), 而抑制 SBE I、SBE II a 却没有改变直链淀粉的含量 (Blauth 等, 2001; Blauth 等, 2002; Satoh 等, 2003)。小麦胚乳中 SBE II a 是主要的合成可溶性淀粉的酶 (Regina 等, 2005), 然而玉米和水稻中主要亚型则是 SBE II b (Gao 等, 1997)。目前已经利用 RNA 干扰技术对小麦中 *SBE IIa* 和 *SBE IIb* 进行了初步的研究 (Regina 等, 2006), 结果是 *SBE IIb* 的沉默并没有改变直链淀粉的含量; 而沉默 *SBE IIa* 却明显提高了直连淀粉的含量, 而且改变了籽粒结构。目前, 该方法在增加小麦的直链淀粉含量上仍然应用。

在玉米中 SBE II a 在叶子中长期活跃, SBE II b 只在玉米和小麦的胚乳中一直表达 (Gao 等, 1996)。而 SBE I 只在小麦 (Morell 等, 1997) 和玉米 (Gao 等, 1996) 胚乳发育的后期表达。在马铃薯中, SBE I 主导合成可溶性淀粉, 而 SBE II 的表达水平很低 (Jobling 等, 1999)。

SBE 是一种具有双重催化作用的酶, 既可切开 α -1, 4 糖苷键又能把切下的短链以 α -1, 6 糖苷键的形式连接于受体链上形成分支。该反应产生的非还原性末端还能以 α -1, 4 糖苷键的形式进一步延伸 (Martin 等, 1995)。SBE 催化生成 α -1, 6 糖苷键, 这在影响支链淀粉的结构方面有很重要的意义。实际上, 植物中都存在许多 SBE 酶亚型 (Burton 等, 1995; Smith 等, 1995), 它们都负责产生不同长度的链和分支点, 只是频率各有不同。这些亚型所产生的不同类型和程度的分支是支链淀粉产生众多簇结构的基础。在淀粉颗粒内部, 亚型 A 侧重于使支链淀粉产生分支, 而亚型 B 则优先考虑直连淀粉 (Takeda 等, 1993)。亚型 A 产生更多 6-9 个葡萄糖单位的短链, 并且少有超过 14 个单位的长链 (Guan 等, 1995), 这一点与亚型 B 不同。

在双子叶植物中, *SBE II* 基因突变 (Bhattacharyya 等, 1990) 或缺失会显著增加直链淀粉的含量 (Jobling 等, 1999)。双子叶植物中 *SBE II* 基因没有亚基 *SBE IIa* 和亚基 *SBE IIb* 的区别。

1.3 抗性淀粉研究进展

1992年 EURESTA(European Flair Concerted Action on Resistant Starch)将抗性淀粉定义为不能被健康人体小肠吸收的淀粉及其降解产物。初步的临床研究表明抗性淀粉有利于人体保健和疾病预防。它具有和膳食纤维相似的特性,食后可增加排便量,减少便秘,这对于预防盲肠炎、痔疮等肠道疾病具有重要意义,同时,抗性淀粉在结肠内的发酵产物短链脂肪酸(SCFA)能降低肠道 pH 值,提高矿物质的吸收利用,还能抑制肿瘤细胞的阶段生长繁殖,减少结肠癌的危险;可抵抗酶的分解,在体内释放葡萄糖缓慢,具有较低的胰岛素反应,对糖尿病有良好的预防功能;可控制血糖平衡,减少饥饿感,特别适宜糖尿病患者食用;RS 能增加脂质排泄,减少热量摄入,且 RS 本身几乎不含热量,因而具有一定的减肥作用。此外,RS 还可以控制肠道细菌增殖和细胞凋亡,抑制潜在的病原体,从而增强机体的免疫功能;而富含 RS 的饲料还可使大鼠的血清甘油三酯和胆固醇水平均低于对照组。

目前普遍接受的抗性淀粉形成机理为:直链淀粉分子在冷却过程中分子链相互靠拢,重新形成结晶结构。淀粉糊化后,分子在水中以游离态形式悬浮,随着温度的降低和储存时间的延长,直链淀粉分子由于氢键的相互作用而互相靠拢,形成螺旋结构,这些螺旋结构又相互靠近形成许多细小的晶核,然后晶核慢慢生长,变大。这种结晶结构构想复杂,且紧密,能够阻碍或防止淀粉酶的活性中心接近淀粉结晶区域的 α -1,4 葡萄糖苷键,因此淀粉酶不能完成与淀粉分子的相互结合,从而无法完成对直链淀粉的消化。支链淀粉的分子链也会由于氢键之间的相互作用而连接到直链淀粉分子所形成的晶体结构上而发生结晶,而这些支链淀粉形成的晶体由于结构不够紧密,可以被人体消化掉(Regina, 2006)。在日常生活中,人们可以通过摄入生的、未加工的天然结构不易消化的淀粉粒以提高抗性淀粉的摄入量。

到目前为止,人类对碳水化合物特别是对 RS 的认识还远不如其他营养素那么清楚,多数的研究集中于抗性淀粉测定方法和制备方法的确立(徐红华等, 2008; 聂凌鸿等, 2008)、生理功效(Regina 等, 2006)、理化特性(王洪燕等, 2007)及在食品应用等领域(Hung 等, 2006; 肖永霞等, 2008),对抗性淀粉形成机理(赵凯等, 2006)及其酶学机制的研究(Regina 等, 2006; Rahman 等, 2007)甚少见诸报道。澳大利亚学者对抗性淀粉的相关研究起步较早,研究较深入。Rahman 等(Rahman 等, 2007)就抗性淀粉的分类和淀粉合成关键酶与抗性淀粉之间的关系进行了较详尽的论述; Regina 等(Regina 等, 2006)利用 RNAi 研究了 SBEII 两个不同同工酶(SBEIIa/IIb)对抗性淀粉合成的影响,并通过 RNAi 技术获得了高抗性淀粉的小麦品种。我国在抗性淀粉的研究上起步较晚,而对小麦抗性淀粉的研究及高抗性淀粉突变体材料的筛选更为薄弱。王琳等(王琳等, 2008)建立了适合小麦籽粒抗性淀粉含量检测的技术体系,完成了 500 多份种质资源和高代品系的筛选;苑会功等(苑会功等, 2010)初步了解了抗性淀粉的理化特性;筛选出 1 对与籽粒高抗性淀粉含量紧密连锁的 SSR 标记(王琳, 2009);庞欢等(庞欢等, 2010)利用双列杂交进行了抗性淀粉遗传规律的研究,同时进行了

QTL 的初步定位。随着研究的深入,对抗性淀粉产生的酶学机制和分子生物学机理有了更深入的理解。

1.4 植物基因功能研究方法

目前常见的研究植物基因功能的方法有:超量表达,插入突变,定向诱导基因组局部突变, RNA 干扰技术等。通过转基因、病毒感染及转座子作用等都能够产生对于细胞发生 RNAi 关键的 dsRNA。

1.4.1 RNAi 的概述

1.4.1.1 RNAi 的发现

RNAi (RNA interference, RNAi) 发现于研究细胞的遗传转化的过程中。在 1990 年, Napoli 和 Stuitje 分别领导的研究小组就发现超量表达查耳酮合成酶基因的矮牵牛植株出现共抑制现象(cosuppression)。1993 年 Assaad 等人 (Assaad 等, 1993) 发现在植物中以随机插入的转基因的拷贝量与基因的表达量成反比。最开始认为是相邻的两个拷贝形成了次级结构, 导致了 DNA 的甲基化, 导致了目的基因不能表达 (Ye 等, 1996)。但后来人们发现, 基因的沉默有两个路径: 转录水平上的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS) 和转录后基因沉默。1999 年 Hamilton 等在 PTGS 层面的基因沉默中发现了大约 23bp 长的与开放读码框相对应的双链 RNAs(double strand RNA, dsRNA) (Hamilton 等, 1999)。20 世纪末, Fire (Fire 等, 1998) 利用双链 RNA 第一次在线虫上实施 RNA 技术成功。后来 Tabara 等在 1998 年发现当线虫浸泡在含有 dsRNA 的溶液中或者吞食表达 dsRNA 的菌后, 也同样可以激发基因沉默 (Tabara 等, 1998)。后来 Hammond 在果蝇中也发现了这种 PTGS 基因沉默, 并将这种技术称作 RNAi (Hammond 等, 2000)。

1.4.1.2 RNAi 的机制

现在, 人们知道 RNAi 是真核细胞用来抵抗外来 RNA 病毒的有效机制, 病毒在复制过程中会产生 dsRNA。RNAi 在植物界被称为转录后基因沉默 PTGS, 在动物研究中被称为 RNA 干扰(RNAi), 而在微生物学界中则被称为基因消除 (CognoinadMacino, 2000)。RNAi 中双链 RNA(dsRNA)的来源有三个: 转基因的的发夹结构 Ah(pRNA) (Wesleyerof, 1999)和 RNA 的反义克隆(ConieraL, 1994)和病毒复制。另外, RNA 沉默效应可以在植物体中转移(Beneditoeral, 2004)。

许多不同的学者提出了若干 RNAi 原理的猜想, 这些模型一般把 RNAi 分三个阶段: RNAi 起始、效应阶段和 RNAi 循环放大。起始阶段包括: Dicer 酶识别外源 dsRNA, 将其切割成 21-23bp 的 siRNA (short interfering RNA, siRNA)。效应阶段: 双链 siRNA 与另一个 RNA 酶结合形成沉默复合物 RISC。siRNA 解旋, 正义链激活 RISC。RISC 识别 mRNA, 并将其剪切成 21-23bp 的 siRNA, 实现 mRNA 的降解 (Hammond 等, 2001)。沉默效应的放大: 以 RNA 为模板的 RNA 聚合物(RNA-dependent RNAPolymerase, RdRP)以新的 siRNA 作为引物, 与 mRNA 碱基互补配对产生新的 dsRNA, 之后又被降解, 以此循环呈放大效应。这样的反应又被称作随机降解性多聚酶链式反应(PCR) (Lipardi C 等, 2001)。不同的物种中 RNA 干扰的机制可能不同, 在植物中 RNAi 主要由 RdRp

主导，而动物中可能是依赖 RISC。

1.4.2 VIGS的建立与发展

VIGS 是指病毒侵染植物后，发生类似 RNA 干扰的一种技术。1995 年 Kumagai 等，1998 年 Ruiz 等以及 1998 年 Kjemtrup 等分别利用带有特定基因片段的不同病毒载体侵染本氏烟，导致了特定目标基因的沉默，开创了应用 VIGS 技术研究植物基因功能的先河。PDS 是类胡萝卜素合成途径中的一个关键酶，而类胡萝卜素在植物中具有光保护作用，PDS 基因的沉默将导致植株产生光漂白现象，这是由于 PDS 基因的 mRNA 降解造成的。1999 年，Baulcombe 等成功实现在马铃薯 X 病毒(Potatovirus X, PVX)基因组中插入 PDS 基因片段，实现了该基因的沉默 (Baulcombe, 1999)。2001 Ratcliff 等 (Ratcliff 等, 2001) 成功改造烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)，建立了该载体的 VIGS 体系。DNA 病毒诱导的基因沉默体系于 1998 年由 Kjemtrup 等通过改造番茄金花叶病毒(Tomato golden mosaic virus, TGMV)建立 (Kjemtrup 等, 1998)。2002 年，Gossele 等(Gossele 等, 2002)通过将外源片段插入改造伴随 TMV U2 的卫星病毒(Satellite tobacco mosaic virus, STMV)基因组，在烟草上实现以 DNA 卫星病毒为载体的基因沉默。2004 年，陶小荣等也成功开发出一种 DNA 卫星载体 (陶小荣等, 2004)。2009 年 (Yamagishi 等, 2009) 苹果潜伏病毒 (Apple latent spherical virus, ALSV) 在大豆上的 VIGS 体系也建立起来。大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)在小麦上的 VIGS 体系也于 2003 年建立起来 (Lacomme 等, 2003)。

VIGS 用于植物功能基因组学研究方面具有以下几个优点：第一，它是一个快速的实验过程。在大多数情况下，沉默一个目的基因到表型的出现只需要 1-2 个月，不需要传代鉴定工作，大大快于通过基因敲除、突变体的生产和分析或稳定转化的 RNAi 植物 (Burch-Smith 等, 2004)。第二，VIGS 诱导不需要基因全长序列，使实验能在没有完整的基因序列信息的情况下也能进行。第三，VIGS 诱导的植物，只会出现短暂且局部基因沉默表型，这不像转基因或突变体中出现功能基因丢失的现象。因此可以用 VIGS 来诱导那些难以通过 RNA 干扰来稳定转化的植株。第四，VIGS 诱导可用于基因家族或多倍体植物的研究，只要同源性大于 85% 的基因序列都有可能受到抑制 (Holzberg 等, 2002)。

1.4.3 VIGS机制

VIGS 与 RNAi 机制相似，其机制也是分为三个阶段：起始、效应和放大。Dicer 识别外源 dsRNA，将其切割产生 siRNA；双链 siRNA 与另一个 RNA 酶结合形成沉默复合物 RISC；siRNA 解旋后正义链激活 RISC 使其识别 mRNA，并切割成 siRNA；RNA 聚合物以 mRNA 为模板产生新的 dsRNA。以此循环。其中 dsRNA 的产生由病毒的复制而来，所以研究 dsRNA 是研究 VIGS 机制的热点。目前，已经在拟南芥中发现了几个编码可能是依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的基因，这几个基因参与病毒诱导的基因沉默。在利用 RNA 病毒诱导突变拟南芥的 PDS 基因沉默的研究中，虽然他们由于突变自身缺失 RdRp，基因仍然被沉默了。因此，RNA 病毒是通过自身的 RdRp 产生 dsRNA。而 DNA

病毒与 RNA 病毒在这一点上有明显的差异。因为 DNA 病毒不含 RdRp, 所以 DNA 病毒介导的 VIGS 的 dsRNA 合成依赖植物自身的 RdRp (Dalmay 等, 2000; Muangsan 等, 2004)。由 DNA 介导的 VIGS 目前两种假说: 第一, DNA 病毒在转录过程中是双向的, 因此产生互补的 mRNA, 而产生 dsRNA; 第二, DNA 病毒中插入的基因片段转录出不正常的异形 mRNA (aberrant RNA), 在寄主自身的 RdRp 参与下生成 dsRNA。卫星 DNA 病毒介导的 VIGS 中, 卫星 DNA 不具有双向转录的功能, 其诱导基因沉默的机制可能是第二种假说。

另外, 在 VIGS 的研究中还发现了一个有趣的现象, 那就是病毒能够抑制基因沉默的发生, 存在病毒抑制子。病毒抑制子可能是通过抑制 dsRNA 或能够与 dsRNA 相结合而抑制基因沉默发生的 (Merai 等, 2006)。这些抑制基因可能影响 VIGS 的效率, 但有研究称可以将抑制基因与载体共连, 通过抑制抑制子的表达来有效的提高 VIGS 的效率。

1.4.4 VIGS 影响因素

理论上插入片段与目的基因之间 23 个 bp 的核苷酸同源即可引起目的基因沉默 (Bartel, 2004), 但在实际操作中效果往往不好, 因此为了提高效率, 常常选择插入数倍于 23 bp 的目标基因片段 (Ekengren 等, 2003; Ratcliff 等, 1997)。但是也不能过长, 否则基因片段易丢失 (Thomas 等, 2001; Jackie Campbell 等, 2010)。有研究表明, 200~500 bp 的插入片段即可使目标基因有效的沉默。 (Burch-Smith 等, 2004; Ekengren 等, 2003; Lu 等, 2003b)。

合适的接种方法是病毒载体成功导入植物细胞的关键, 是病毒能够在寄主内繁殖并有效诱导目的基因沉默的第一步。当前对于大多数宿主物种来说, 农杆菌介导的病毒侵染是方便而高效的方法。但是对于单子叶植物, 农杆菌侵染法不能有效的起作用 (姚丹青 等, 2009)。此外, 其他的病毒接种方法还有牙签穿刺 (Lu 等, 2003a)、注射 (Fu 等, 2005)、快速喷射 (Liu 等, 2002a)、真空渗透 (Ekengren 等, 2003) 等。

病毒的传播和植物的生长情况都会影响基因沉默的成功率, 而环境又影响着病毒的传播和植物的生长情况 (Burch-Smith 等, 2004), 其中温度对它们的影响最大。各种不同的病毒载体侵染不同的植物, 所需要的高效诱导基因沉默的温度也不一样。TRV 在番茄体系中最有效的温度是 22°C 及以下。而 TRV 在烟草 VIGS 体系中的最适温度则是 25°C 左右 (Burch-Smith 等, 2004; Ekengren 等, 2003; Liu 等, 2002a; Nethra 等, 2006); 大麦条纹花叶病毒在大麦上最佳的诱导基因沉默的温度是 25°C-29°C。此外, Fu 等 (Fu 等, 2006) 的研究表明, 较低的温度和较干燥的环境有利于基因沉默效果的提高和基因沉默的持久度的增加。张立荣 (张立荣 等, 2011) 等曾构建小麦 *PDS* 基因的 VIGS 体系, 得出在 25°C-30°C 的温度下进行基因沉默的研究较合适。Harvinder 等 (Harvinder 等, 2011) 利用人工气候室控制温度在小麦上实施 BSMV-VIGS 实验, 结果表明最佳的温度条件是白天 22°C/夜间 18°C。

VIGS 在鉴定功能基因组方面具有诸多优越性。VIGS 能够直接在当代植株沉默目的基因, 不存在传统方法中的诸多困难, 目的基因缺失的表型在当代就能够鉴定出来, 这

体现了 VIGS 快速高通量的优点, 具有重要意义。但是, VIGS 也存在局限性。目前大多数的 VIGS 体系不能完全抑制目标基因表达, 而微量残留的转录本仍然有可能发挥该基因的功能, 从而不会产生表型变化。此外, VIGS 也存在一些不稳定性, 如在同一批次的植株中, 或在不同批次的重复实验中 VIGS 产生的效果可能不同。因此, 在载体的改进, 条件的控制和摸索, 以及实验技术方面仍有改进的空间。如侵染的部位、次数等也可能影响基因的沉默。这方面的研究有待进一步深入。

1.4.5 VIGS研究进展及其在小麦中的应用

VIGS 体系已经在大豆(吕山花 等, 2010)、番茄(张策 等, 2007)、烟草(Gossele 等, 2002)和豌豆(宋伟杰 等, 2007)等双子叶植物中建立, 为了能在单子叶植物中利用 VIGS 技术实现基因沉默, 许多单子叶植物病毒也被改造成 VIGS 载体(Oikawa, 2007)。目前已知且应用广泛的病毒载体或系统有: 烟草花叶病毒、马铃薯 X 病毒、番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)、烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)、卫星病毒诱导的沉默系统(satellite virus-induced silencing system, SVISS)、甘蓝缩叶病毒(cabbage leaf curl virus, CbLCV)、玉米条纹病毒(maize streak virus, MSV)等(Burch-Smith 等, 2004; 王宏芝 等, 2005; Palmer 等, 1999)。大麦条纹花叶病毒(Lacomme 等, 2003), 以及小麦矮缩病毒(wheat dwarf virus, WDV)等(Matzeit 等, 1991)也都已成功应用。由于 BSMV 寄主多样(McKinney 等, 1965)而成为了单子叶植物, 如水稻和小麦中应用广泛的载体(Holzberg 等, 2002), 成为研究单子叶植物基因功能的重要工具。最近, 雀麦花叶病毒株 Tall-fescue 也已成功改造成可感染谷稻类作物等单子叶植物的 VIGS 载体(Ding 等, 2006)。

VIGS 技术在改良作物品质方面具有很高的应用价值(Tang, 2004)。李加瑞等应用 RNA 干扰技术以 *Wx* 基因为靶基因极大地降低了小麦中直链淀粉的含量, 而 Harvinder S 等应用 VIGS 技术以 *GBSS* 基因为靶基因也同样降低了小麦中直链淀粉的含量(Harvinder S, 等, 2011)。Kusaba 等利用 RNAi 技术干扰了麦谷蛋白基因的表达, 产生了低麦谷蛋白的稻米 LGC-1 (low gluten content)。郭志鸿 等(郭志鸿 等, 2008)构建了含马铃薯 *SBE1* 基因片段和 *SBE II* 基因片段的 RNA 干扰载体, 利用农杆菌介导法转化, 获得了直链淀粉含量 59.31%-87.14% 的试管转基因马铃薯。

迄今, 病毒载体的转染技术还没有形成一套非常成熟有效的方法, 已有的报道也只是在少数物种中获得成功, 许多接种条件还需要进一步优化。因此, 对于开发新的病毒载体, 尝试新的宿主植物或进行某些尚无前人研究的实验时, 对 VIGS 体系进行条件探讨和优化对于利用该技术在植物中进行基因功能的研究很有必要。

大麦条纹花叶病毒有 3 条 RNA 链: α 、 β 、 γ , 为短棒状病毒。小麦染病的症状为深绿和浅绿相间的不规则条纹, 而早期会出现新叶基部发黄白的条纹, 同时伴随株高降低, 雌蕊育性降低, 种子不饱满等。摩擦法可以使小麦感染 BSMV, 但在自然界中 BSMV 主要以侵染种子及花粉传播的方式传播。BSMV 病毒可以在单倍体细胞中存活和繁殖。该载体的表达能力是 Ti 质粒载体的数倍。因其可以寄生 Ti 质粒不能侵染的单子叶经济

作物如大麦、小麦、玉米、水稻等而被研究者选中开发为工程载体。此外 BSMV 载体拥有较大的基因组，可以容纳较大的外源基因，这也是研究者们所喜爱的一个优点。

目前为止，BSMV-VIGS 技术在小麦中的应用已经有十年多的时间，BSMV 载体主要应用在小麦、大麦、燕麦、野生二粒小麦、簇毛麦、二穗短柄草等禾本科植物（李淼淼等，2013）。目前研究者们主要是改造 BSMV 的 β , γ 分子，其中以改造 γ 分子的报道居多。Holzberg 等（Holzberg 等，2002）改造 γ b 分子，首次实现 BSMV-VIGS 在大麦上应用，Cheng 等（Cheng 等，2011）修饰了 BSMV 的 γ b 分子，使其具有了高通量克隆的特性。另外改造 BSMV 的 β 分子的 VIGS 系统也成功应用（Kawalek 等，2012）。此外，Campbell 等（Campbell 等，2010）同时利用 β 、 γ 分子插入不同的基因，在大麦上同时实现了两个基因的沉默。

BSMV-VIGS 研究的基因涉及了包括植物生长发育、抗病虫、抗干旱、品质改良等过程（李淼淼等，2013）。另外，最近 Bennypaul 等（Bennypaul 等，2012）还通过构建 *PDS* 基因的 BSMV 重组载体研究 VIGS 的遗传性。Kawalek 等（Kawalek 等，2012）利用 BSMV-VIGS 技术研究了与小麦衰老有关的 *PLD* 基因的功能。Bennypaul 等（Bennypaul 等，2012）利用该技术实现了小麦根中 *COII* 基因的沉默。

BSMV-VIGS 技术在小麦上研究与抗病虫相关的基因功能方面是一个很有效的工具，研究所涉及的基因包括与抗条锈病有关的 *TaHLRG*、*PTaRtL* 和 *TaSBL* 基因（刘迪等，2008）；*TaSTK* 基因（张宁宁等，2008）；抗叶锈病有关的基因 *Lr21*、*RAR1*、*SGT1* 和 *HSP90*（Scofield 等，2012）、*TaRAR1* 基因（张立荣等，2013）；抗白粉病有关的基因 *Mlo* 基因等（Várallyay 等，2012）、抗大麦黄矮病有关的 *TNBL1* 基因（赵丹等，2011）及与抗蚜虫有关的基因 *WRKY53*（Van 等，2010）等。其中 Várallyay 等（Várallyay 等，2012）的研究中，同时沉默了 *PDS* 基因和 *Mlo* 基因；Van 等的研究是首次利用 VIGS 技术研究小麦抗虫基因的报道。

VIGS 技术也可以研究与抗逆相关的基因，如抗干旱胁迫相关的基因 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *SAMS*、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因 *SAMDC* 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *γ -ECS*（李昌澎等，2011）。在品质改良方面，Ma 等（Ma 等，2012）利用 VIGS 技术研究了与蛋白质及淀粉合成有关的基因 *HMW-GS1Bx14* 的功能。这也是首次利用 BSMV-VIGS 技术研究小麦穗子和籽粒中的基因功能的报道，对后来研究类似基因的研究者来说很有借鉴意义。Bennypaul 等（Bennypaul 等，2012）也通过构建插入 *GBSS* 基因片段的 BSMV-VIGS 载体，实现了小麦籽粒中 *GBSS* 基因的沉默，降低了籽粒淀粉中直链淀粉的含量。

VIGS 在应用中存在沉默不稳定和沉默时间短等问题，因此有待于进一步发现和改造出新的更稳定高效的病毒载体，或者通过优化 VIGS 体系也可能使问题有所改善。再者，可以把 VIGS 技术作为一个辅助技术，结合传统的方法，扬长避短，充分发挥 VIGS 在基因功能研究中的潜力。

1.5 本研究的目的是与意义

小麦是重要的粮食作物与工业原料，穗作为小麦的主要功能器官，是小麦经济价值最直接的体现。籽粒中的淀粉一直是育种家比较关心的重要性状，其含量和种类对小麦的品质和用途具有重要的影响，了解其遗传规律和关键基因的功能并对其进行有效选择和改造是小麦遗传育种研究的主要目标和重要研究课题。但这些性状是由多基因控制的数量性状，利用传统的方法对这些性状的选择效率很低，而且准确性不高。特别是随着功能基因组时代的到来，人们通过测序获得了大量的序列信息，这无疑给穗部功能基因研究带来机遇，但庞大的序列信息也使研究者们面临着巨大的挑战。传统研究基因功能的方法在快速、简便和高通量方面越显乏力。VIGS 技术具有研究周期短、可在不同的遗传背景下生效、不需要遗传转化以及能在不同的物种间进行基因功能的快速比较等优点(Burch-Smith 等, 2004; 王宏芝 等, 2005), 而且具有高通量等特性, 为小麦品质性状关键基因的研究提供了高效、准确的手段。虽然目前 BSMV 诱导的基因沉默方法已在小麦中有应用, 并且取得了一些成果, 但基于小麦淀粉基因在小麦抽穗期进行 VIGS 体系优化的研究还有待进一步深入。

大麦条纹花叶病毒, 由于其广泛的寄主范围成为单子叶寄主良好的 VIGS 沉默载体, 为水稻和小麦等重要单子叶作物功能基因组研究提供了有效的工具, 使利用 VIGS 诱导研究单子叶植物基因沉默进而研究基因功能成为可能。本研究以新春 11 号小麦品种为实验材料, 选择小麦 *PDS* 基因和与淀粉合成关系较密切的 *SBEIIb* 基因为靶基因, 以 *PDS* 基因为指示基因, 构建目的基因片段的重组表达载体, 接种在小麦叶片和幼穗上, 在不同温度条件、接种方法、接种量的处理下, 诱发植物发生基因沉默, 抑制 *PDS* 基因的表达, 定性定量分析基因沉默, 建立相对最优的 VIGS 体系, 并利用该体系进行了 *SBEIIb* 基因功能的初步研究, 为以后开展小麦淀粉合成酶基因功能的研究提供了理论依据和技术指导。

第二章 材料与amp;方法

2.1 试验材料、试剂及仪器

2.1.1 试验材料

小麦品种新春11号由石河子大学麦类作物研究所提供。

2.1.2 试验试剂

总RNA提取试剂RNAiso Plus (Code No: 9108) 和Fruit-mate™ for RNA purification (Code No: 9192)、pMD19-T Vector、T4 DNA Ligase、实时荧光定量PCR染料SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)、氨苄青霉素 (AMP) 及cDNA第一链合成试剂盒由宝生物工程(大连)(TAKARA)有限公司提供; 2×Es Taq MasterMix(含染料)酶购自北京康为世纪生物科技有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂粉购于美国Sigma公司; 限制性内切酶购自美国Thermo公司(北京); 体外转录试剂盒mMessage mMachine T7 in vitro transcription kit购自美国Ambion 公司; 高纯度质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 抗性淀粉试剂盒Megazyme RS assay kit 购自Megazyme International (Ireland)。引物合成和基因测序工作由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。大麦条纹花叶病毒的 α 、 β 、 γ 及 γ -PDS载体及接种缓冲液配方FES由加拿大农业部列桥研究中心John Lu博士提供。大肠杆菌Top1 0菌种由新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室保存, 感受态大肠杆菌由本实验室制备。

2.1.3 试验仪器

PCR 仪(Bionetra Tgradient); 离心机(Eppendorf 5415D); 超速低温离心机(Eppendorf Centrifuge5810R); 电泳仪(BioRad PAC300); pH 仪(Sartorius Professional Meter PP-20); 恒温摇床(金怡, THZ-82B); 核酸测定仪(NanoDrop-1000); 紫外凝胶成像系统(Bio Imaging System); 实时荧光定量 PCR 仪 Roche Light-Cycler® 480 (Roche Diagnostics, USA); 722G 可见光分光光度计(上海精科); 恒温培养箱(上海精宏 DNP-9612)。

2.2 试验方法

2.2.1 小麦籽粒总RNA的提取及cDNA第一链的合成

取花后 12 d 的小麦穗子, 液氮研磨, 按照总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(Code No: 9108) 和 Fruit-mate™ for RNA purification (Code No: 9192) 说明提取总 RNA。用核酸分析仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 并按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明进行逆转录反应。然后以小麦 *Actin* 基因作为内参基因, 通过 PCR 检测反转录产物质量。*Actin* 基因引物上游: TGTGCTTGATTCTGGTGATGGTGTG; 下游: CGATTTCCTCCGCTCAGCAGTTGT。反应体系(10 μ L): 2×Es Taq MasterMix 5 μ L、cDNA 第一链合成产物和 *Actin* 上、下游引物(10mmol/L) 各 1 μ L、ddH₂O 2 μ L。扩增程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 40s, 54℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共 30 个循环; 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2.2.2 小麦各目的基因的克隆和测序

2.2.2.1 小麦PDS基因片段克隆

根据GenBank中公布的小麦*PDS* (FJ517553.1)基因序列,选取特异序列设计引物(表1),并引入*Pac I*和*Not I*酶切位点。184 bp *PDS*基因片段的PCR扩增体系(10 μ L): 2 \times Es Taq MasterMix 5 μ L、cDNA第一链模板和上、下游引物(10mmol/L)各1 μ L、ddH₂O 2 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 55 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸30s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7min。

2.2.2.2 小麦 *SBE IIb* 基因片段的克隆

根据 GenBank 中公布的小麦 *SBE IIb* (AY740401.1) 基因序列,选取特异序列设计引物,并引入 *Pac I* 和 *Not I* 酶切位点(表1)。181 bp *SBE IIb* 基因片段的 PCR 扩增体系(10 μ L): 2 \times Es Taq MasterMix 5 μ L、cDNA 第一链模板和上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L、ddH₂O 2 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C变性 30s, 58 $^{\circ}$ C退火 40s, 72 $^{\circ}$ C延伸 40s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸 10min。

以上 184 bp 的 *PDS* 基因片段和 181 bp *SBE IIb* 基因片段的 PCR 扩增产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并利用 DNA 胶回收试剂盒分别回收目的条带。然后按照 pMD19-T Vector 试剂说明书将回收产物分别与 pMD19-T Vector 连接,构建 pMD19-*PDS*, pMD19-*SBE IIb* 载体,转化大肠杆菌 TOP10。菌液 PCR 阳性菌落提取质粒酶切验证。各目的基因的菌液 PCR 反应体系和扩增程序和克隆各目的基因的一致,只将模板换成菌液。菌液 PCR 阳性菌落按照高纯度质粒小提中量试剂盒(天根公司);酶切体系为:*Pac I* 1 μ L; 10 \times M Buffer 2 μ L; 质粒 1 μ g; 加 ddH₂O 补至 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育, 2h, 65 $^{\circ}$ C 20min。然后再向体系中加入 *Not I* 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 2h, 65 $^{\circ}$ C 20min。酶切产物经用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。阳性克隆菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

表 1 *SBE IIb*、*PDS* 基因片段扩增引物
Table 1 PCR amplification primers of *SBE IIb*、*PDS* genes partial sequences

引物	引物序列(5'-3')	工具酶
Primers	sequences	tools enzymes
<i>SBE IIb</i> 上游	ATATTAATTAAGGTCAGTTGGGCAGTTAGGTTGGA	<i>Pac I</i>
<i>SBE IIb</i> 下游	TATGCGGCCGCCTTGCGGCCGAAGAGCAGCGATGGC	<i>Not I</i>
<i>PDS</i> 上游	ATATTAATTAAGCTGGATGAAAAGCAGGGTGTTC	<i>Pac I</i>
<i>PDS</i> 下游	TATGCGGCCGCCTACTTTCAGGAGGATTACCATCC	<i>Not I</i>

2.2.3 VIGS重组载体的构建

大麦条纹花叶病毒(BSMV)的基因组是由 α 、 β 、 γ 三部分基因组构成,其中目前主要对 BSMV 的 γ 基因组进行改造用于 VIGS 的研究中。本实验用到的 α 、 β 、 γ 和重组 γ -*PDS* (在 γ 基因组下游改造一个多克隆位点并插入一段小麦的 *PDS* 基因)质粒是由加拿大农业部列桥农业中心 John Lu 博士惠赠。通过利用酶切连接的方法用已经克隆的 184 bp *PDS* 基因片段和 181 bp *SBE IIb* 基因片段分别替换重组 γ -*PDS* 质粒中的 *PDS* 基因片段构建 γ -*PDS*, γ -*SBE IIb* 重组 BSMV 载体。 γ -*PDS* 和 γ -*SBE IIb* 质粒的酶切体系同 pMD19-*PDS*

和 pMD19-SBE II b 的酶切体系, 酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。经 DNA 胶回收试剂盒回收各个目的基因片段及 γ -PDS 酶切得到的 γ -片段。然后以上回收获得的带有 *Pac I* 和 *Not I* 酶切粘性末端的各目的基因片段 184 bp *PDS*, 181 bp *SBE II b* 分别和同样带有 *Pac I* 和 *Not I* 粘性末端的 γ 片段进行连接构建各目的基因的 BSMV 重组载体。连接体系为: T4 DNA Ligase 1 μ L; 10 \times Rapid Ligation Buffer 2 μ L; γ -载体片段 3 μ L; 目的基因片段 6 μ L; ddH₂O 8 μ L。轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 TOP10。各目的基因的菌液 PCR 反应体系和扩增程序与克隆各目的基因的体系一致, 只将模板换成菌液。菌液 PCR 阳性菌落利用高纯度质粒小提中量试剂盒 (天根公司) 提取质粒。

2.2.4 VIGS载体的线性化及纯化

经过验证的重组BSMV载体及 α , β , γ 分别提取高纯度质粒用于载体的线性化。线性化体系见表 2。

表 2 酶切反应体系
Table 2 enzymes reaction system

质粒类型	模板量	工具酶	10 \times buffer	ddH ₂ O	温度
α	2 μ g	Mlu I :2 μ L	H:5 μ L	补至 50 μ L	37 $^{\circ}$ C
β	2 μ g	Spe I :2 μ L	M:5 μ L	补至 50 μ L	37 $^{\circ}$ C
γ	2 μ g	Mlu I :2 μ L	H:5 μ L	补至 50 μ L	37 $^{\circ}$ C
γ -PDS	2 μ g	BssH II :2 μ L	M:5 μ L	补至 50 μ L	37 $^{\circ}$ C
γ -SBE II b	2 μ g	BssH II :2 μ L	M:5 μ L	补至 50 μ L	37 $^{\circ}$ C

取 2 μ L 酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 以上各质粒分别酶切 5 管共 10 μ g, 确保酶切各质粒模板已完全线性化。将相同质粒混合后用于纯化。具体纯化步骤参考马猛等 (马猛 等, 2012) 的方法。

- (1) 分别向各线性化质粒中加入 0.1% DEPC 水至 500 μ L。
- (2) 然后加入 500 μ L 酚氯仿 (苯酚: 氯仿=24: 1) 抽提。
- (3) 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 15 分钟。
- (4) 吸取约 450 μ L 上清液, 加入 45 μ L NaAc (PH5.2, 3 M) (1/10 体积), 然后加入 1000 μ L 预冷无水乙醇, 混匀后, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜沉淀。
- (5) 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 15 分钟。
- (6) 弃掉上清, 加入 70% 的乙醇漂洗;
- (7) 4 $^{\circ}$ C, 7500 rpm 离心 5 分钟;
- (8) 弃上清, 用移液枪尽量吸除 70% 乙醇, 超净台上凉干模板; 加入 30 μ L DEPC 水溶解, 取 1 μ L 测定浓度, 并计算后稀释至终浓度为 200~300 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2.5 体外转录

将经过线性化纯化的质粒作为模板, 按照 Ambion 公司体外转录试剂盒 mMessage mMachine T7 in vitro transcription kit 给出的方法进行体外转录, 体系为: 2 \times NTP/CAP 10

μL ; $10\times$ Reaction Buffer $2\ \mu\text{L}$; Linear template DNA $0.5\ \mu\text{g}$; Enzyme Mix $2\ \mu\text{L}$; Nuclease-free Water 补至 $20\ \mu\text{L}$ 。轻轻混匀后, 37°C 恒温孵育, 2h。 $10\ \mu\text{L}$ 体系各试剂加样量相应减半。反应结束后, 取 $0.5\ \mu\text{L}$ 用 0.1% DEPC 水稀释 5 倍后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。其余 -70°C 冰箱保存或直接用于接种实验。

2.2.6 接种

取 α 、 β 、 γ 及重组的 γ -PDS, γ -SBE II b 转录产物, 参照 Scofield 等 (2005) 报道的方法进行接种。首先, 将 α 、 β 和 γ/γ -PDS/ γ -SBE II b 转录产物按 1:1:1 等体积混合, 然后加入 7.5 倍 FES Buffer, 制得 $500\ \mu\text{L}$ 的 BSMV:00/BSMV: PDS/BSMV: SBE II b) 接种混合液。

在小麦刚抽穗时选定生长良好的植株, 带无粉尘乳胶手套, 将 α 、 β 和 γ (γ -PDS) 分别采用注射法和摩擦法接种, 以讨论接种方法对病毒诱导基因沉默的影响。注射法采用医用注射器, 注射于幼穗基部的表皮下。摩擦法以 FES 为介质, 摩擦接种于叶片或穗子以探讨接种部位对该病毒诱导基因沉默的影响。用拇指和食指夹着在叶片或穗子将接种液从底部到顶部的方向进行 5 次来回摩擦接种, 以不出现严重损伤为度。在穗部设置分别接种一次和两次的组合, $20\ \mu\text{L}/$ 穗, 以讨论接种量对该病毒诱导基因沉默体系的影响。

每个构建独立接种, 每次 10 株。同时设置空白对照 (野生型植株)。接种后, 喷少许 nuclease-free 水, 用透明保鲜膜包裹 24 h。取掉保鲜膜后, 分别在 22°C 和 28°C 的温度下培养, 以观察温度对该病毒诱导基因沉默体系的影响, 获取最优的该 VIGS 体系条件。光照周期 16h 光照, 8h 暗培养, 在人工气候室进行培养定时观察植株变化。接种 α 、 β 、 γ 混合液的植株标记为 BSMV:00; 接种重组的 α 、 β 、 γ -PDS(γ -SBE II b) 混合液的植株分别标记为 BSMV: PDS(BSMV: SBE II b)。

接种后, 每天观察、记录接种部位变化, 并定期取材。取材方法为: 利用灭菌镊子夹取接种穗的小穗或叶片于新的锡箔纸中包裹, 液氮冷激后置于 -70°C 冰箱中, 每个处理重复三次。

α 、 β 和 γ -SBE II b 混合接种液的接种条件以上述得出的理想条件为条件进行接种。

FES Buffer 配方为: 甘氨酸 $3.75\ \text{g}$; K_2HPO_4 $5.22\ \text{g}$; 焦磷酸钠 (sodium pyrophosphate decahydrate) $5\ \text{g}$; 皂土 (bentonite) $5\ \text{g}$; 硅藻土 (celite) $5\ \text{g}$; 用 DEPC 水定容到 $500\ \text{ml}$ 。

2.2.7 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR) 检测

采用实时荧光定量 PCR 的方法检测各目的基因的相对表达量。根据 NCBI 中公布的小麦 *PDS* (FJ517553.1), *SBEIIb* (AY740401.1) 及 *Actin* (AY423548.1) 基因的序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计实时荧光定量 PCR 引物。

PDS: F 5' TCGAAGGGTTCTATCTGG 3',

PDS: R 5' CTACAACAATGTGGCAAT 3';

SBEIIb: F 5' GGTCAGTTGGGCAGTTAGTTGGA 3',

SBEIIb: R 5' TTGCGCCGAAGAGCAGCGATGGC 3';

Actin: F 5' TGTGCTTGATTCTGGTGATGGTGTG 3',

Actin: R 5' CGATTTCCCGCTCAGCAGTTGT 3'。

先经普通 PCR 预实验测试所需模板量及退火温度范围。在此基础上, 以稀释 10 倍

的 cDNA 为模板,退火温度为 57°C。实时荧光定量 PCR 用 DNA Master SYBR Green I 染料在 Roche Light-Cycler® 480 (Roche Diagnostics, USA)CFX96 Touch™仪器上操作,反应程序: 95°C 预变性 2min; 95°C 变性 15s, 57°C 退火 30s, 72°C 30s, 40 个循环。

实时荧光定量 PCR 反应体系: cDNA 1 μL; 上/下游引物 (10 mmol/L) 各 0.3 μL; SYBR Premix Ex Taq 5 μL; ddH₂O 3.4 μL。

每个样品及对应的内参反应均进行三次。实时荧光定量 PCR 结果的计算参考 Livak (Livak 等, 2001) 的方法。

2.2.8 小麦籽粒直链淀粉和抗性淀粉含量的测定

小麦籽粒直链淀粉含量的测定参考金玉红 (金玉红 等, 2009) 报道的方法。

抗性淀粉测定方法参照 Megazyme RS assay kit (Megazyme International, Ireland) 试剂盒说明书推荐方法, 结合本实验室王琳 (王琳 等, 2009) 改进的方法进行测定。

2.2.9 叶绿素含量的测定

测定对照组和处理植株小穗和叶片叶绿体色素提取液中叶绿素 a、b 含量, 测定该提取液在 2 个特定波长下的吸光度值, 并根据叶绿素 a 与 b 在该波长下的吸光系数求出各自的浓度。关系式如下: $A_{663}=82.04C_a+9.27C_b$

$A_{645}=16.75C_a+45.6C_b$ (Ca、Cb 为叶绿素 a、b 浓度; A 为特定波长下的吸光度)。

2.3 数据统计分析

DNAMAN5.2.2 等软件用于核苷酸序列比对, 拼接等。Primer Premier 5.0 软件用于引物的设计。Microsoft Office Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件用于计算平均数和差异显著性分析等。

第三章 结果与分析

3.1 小麦穗部实施VIGS体系的优化

3.1.1 小麦籽粒总RNA的提取及cDNA第一链的合成

在灌浆期间的小麦籽粒中提取的总 RNA 经核酸分析仪检测显示 OD260/OD280: 1.95-1.98, OD260/OD230: 2.0-2.25, 浓度在 3000 ng/ μ L 左右。取 1 μ L 总 RNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 28S 和 18S 条带明亮、清晰, 28S 条带亮度是 18S 的两倍, 说明提取的小麦籽粒总 RNA 的质量较高, 可以用于下游的实验(图 1)。然后利用提取的高质量的总 RNA 按照 TAKARA 公司的反转录试剂盒进行 cDNA 第一链的合成, 用小麦 Actin 基因作为内参检测了 cDNA 第一链合成的质量(图 2)。

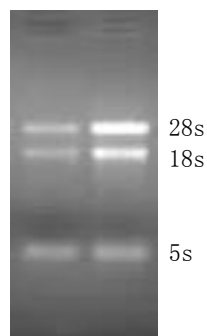


图 1 小麦总 RNA 的提取电泳图
Fig 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

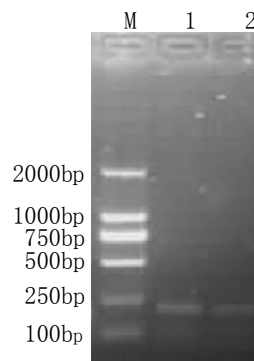


图 2 *Actin* 基因片段的 PCR 产物
Fig 2 The PCR products of *Actin* gene segment
注: M:DNA 标准分子量; 1、2. *Actin* 的 PCR 扩增。

3.1.2 小麦 *PDS* 基因的克隆和测序

根据小麦 *PDS* 基因设计的特异引物性进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳结果显示, 目的基因片段大小正确, 条带清楚(图 3)。DNA 胶回收试剂盒回收的电泳产物和 pMD19-T Vector 进行连接, 转化大肠杆菌 Top10。菌液 PCR 将阳性克隆提取质粒进行酶切验证。*Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切结果表明, 目标条带大小正确(图 4), 说明 *PDS* 基因片段已连接到 pMD19-T Vector 载体上。测序结果经 Blast 对比显示: 获得一条通读的重组基因片段, 克隆的 *PDS* 基因片段长 184 bp。序列为: ACTGGATGAAAAGCAGGGTGTTCCTGATCGAGTCAACGACGAGGTTTTTATTGC AATGTCCAAGGCCCTCAATTCATAAACCCTGACGAGTTATCCATGCAGTGCATT CTGATTGCTCTAAACCGTTTTCTCCAGGAGACGCATGGCTCGAAAATGGCATTCTT GGATGGTAATCCTCCTGAAAGTAGGCGGCCGCATA。序列分析表明: *PDS* 基因片段与 GenBank 中登录的 *PDS* (FJ517553.1) 序列同源性为 97%, 并命名为 pMD19-PDS。

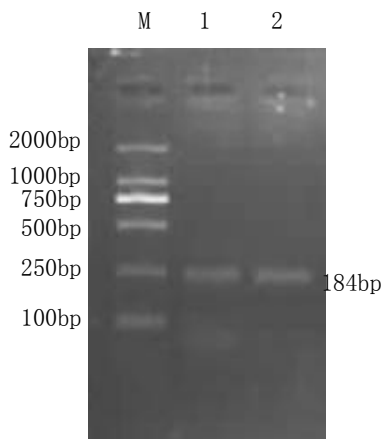


图 3 *PDS* 基因片段的 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR amplification products of *PDS* gene by agarose gel electrophoresis

注: M:DNA 标准分子量; 1. 2. *PDS* 的 PCR 产物;
M: DNA Marker. 1 PCR amplification products

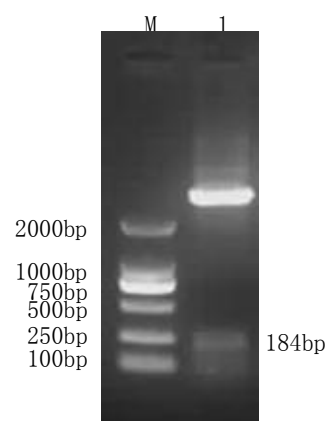


图 4 pMD19-*PDS* 质粒酶切验证

Fig. 4 The double digestion of pMD19-*PDS*

注: M:DNA Marker. 1. pMD19-*PDS* *Pac I/Not I* 限制性酶切
M: DNA Marker. 1 The double digestion of pMD19-*PDS* plasmids

3.1.3 VIGS重组载体的构建

分别提取 pMD19-*PDS* 及 γ -*PDS* 载体的质粒, 通过 *Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切后胶回收目的基因片段和 γ -*PDS* 载体的大片段部分。将带有 *Pac I* 和 *Not I* 酶切粘性末端的 *PDS* 基因片段与同样带有 *Pac I* 和 *Not I* 酶切粘性末端的 γ -片段进行连接, 转化感受态大肠杆菌 Top10。菌液 PCR 阳性的克隆提取质粒进行酶切验证。*Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切结果表明, 目标条带 184 bp, 大小正确 (图 5), 确定目的基因片段已经连接到 γ 载体上, 说明成功构建了 γ -*PDS* 的 VIGS 重组载体。

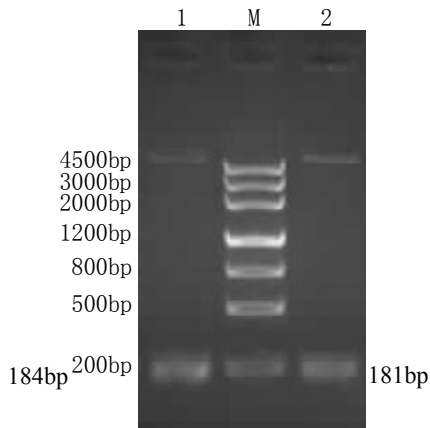


图 5 γ -*PDS* 和 γ -*SBE II b* 酶切图

Fig. 5 The double digestion of γ -*PDS*

注: M. DNA 标准分子量; 1. γ -*PDS*. 2 γ -*SBE II b*
M: DNA Marker 2000. 1. γ -*PDS*. 2 γ -*SBE II b*

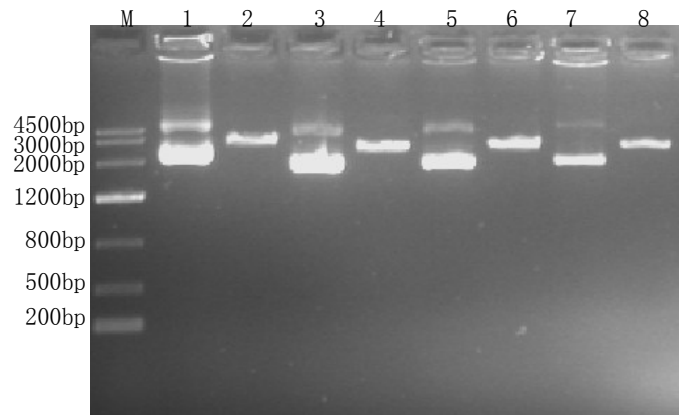


图 6 BSMV 质粒的线性化

Fig. 6 linearized plasmids of BSMV

注: M: DNA标准分子量; 1. α ; 2.线性化 α ; 3. β ; 4.线性化 β ;
5. γ ; 6.线性化 γ ; 7. γ -*PDS*; 8.线性化 γ -*PDS*
M: DNA ladder; 1. α ; 2. linear α ; 3. β ; 4. linear β ; 5. γ ; 6. linear γ ;
7. γ -*PDS*; 8. linear γ -*PDS*.

3.1.4 VIGS载体的线性化

体外转录的模板需要是线性化的 DNA, 所以需要将质粒进行线性化处理, 因此构建的 γ -*PDS* 的 VIGS 重组载体及 α , β , γ 质粒均需要进行线性化处理。各质粒经过线性化处理后电泳结果显示, 条带大小与预期一致, 条带分明, 已完全线性化 (图 6), 说明已

经完全将各质粒进行线性化处理。

3.1.5 体外转录

各质粒经过线性化及纯化的处理后，按照 Ambion 公司体外转录试剂盒 mMessage mMachine T7 in vitro transcription kit 说明书进行体外转录。各个质粒的体外转录产物取 0.5 μL 用 0.1% DEPC 水稀释 5 倍后进行电泳检测，结果如（图 7）显示，各个线性化质粒体外转录后分别得到大量的相应的 RNA 产物，条带明亮，无明显拖尾，表明体外转录效果良好，可以用于接种试验。

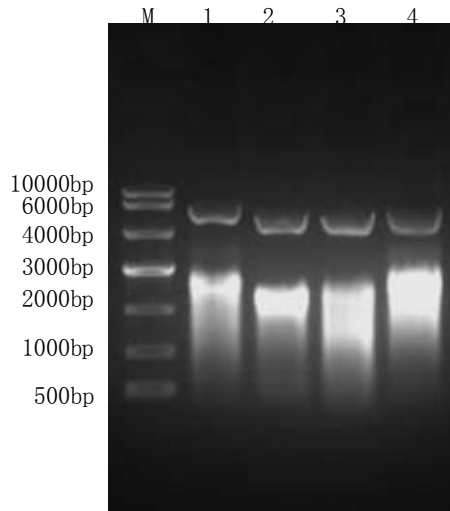


图 7 BSMV 重组载体的体外转录

Fig. 7 BSMV recombinant vector for in vitro transcription

注：M. DNA 标准分子量；1.α；2.β；3.γ；4.γ-PDS；
M DNA Marker；1.α；2.β；3.γ；4.γ-PDS；

3.1.6 接种试验

PDS 基因是一个非常保守的基因，如前所述，已有多个研究利用内源或外源的 *PDS* 基因沉默了多个物种中的 *PDS* 内源基因。由于影响 VIGS 基因沉默的因素有很多，为了在小麦上建立并实施 VIGS 体系，本研究使用控制变量法对各个因素如接种方法、接种部位、培养温度、接种量等进行逐一的比较。

3.1.6.1 利用摩擦法和注射法接种小麦穗部的比较

利用小麦内源 *PDS* 基因为报告基因，采用不同的接种方法探讨其对 VIGS 诱导基因沉默的影响。实验中选择了注射法和摩擦法来分别侵染抽穗期的小麦穗部（图 8）。结果发现，采用两种方法接种的植株均在 5-8 dpi 出现明显的光漂白现象（图 9）。但是采用注射法接种的植株的侵染成功率只有 20%，而摩擦法接种植株的侵染成功率达到了 90%以上。此外，小麦秆节间中空，带形叶片叶肉薄，注射法易刺穿叶片，注射完成后注射液易外渗；同时，注射法劳动量大，多耗费将近一倍的时间，稳定性差，效率较低，不适合高通量应用。而摩擦法速度快，较大接种面积使其具有更高的成功率而且操作简单，有利于 BSMV 对植物的侵染。因此，本研究认为利用摩擦法在抽穗期的小麦穗部实施 VIGS 技术要比利用注射法更有效。



图 8 注射法和摩擦法接种

Fig. 8 Inoculating by Injection and Rubbing

注：注射法（左）；摩擦法（右）
Injection (left); Rubbing(right)

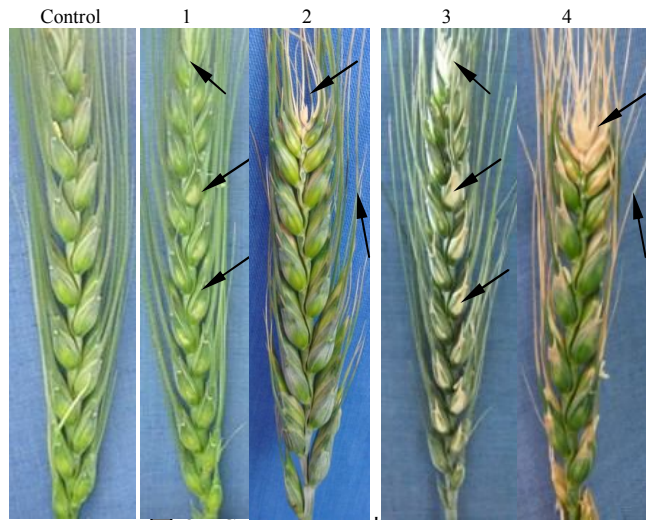


图 9 BSMV:γ-*PDS* 接种及对照结果

Fig. 9 Symptom of gene silencing and the control

注：1. 摩擦法 8 dpi; 2. 注射法 8 dpi; 3. 摩擦法 15 dpi; 4. 注射法 15 dpi;

The photobleaching symptoms on spikes inoculated by rubbing and injection at different development stages

3.1.6.2 利用摩擦法接种小麦穗部和旗叶的比较

除接种方法之外，对小麦不同接种部位进行了探讨。即采用摩擦法分别接种抽穗期小麦的穗部和旗叶，置于 21-24℃ 的人工气候室中，保持其他的条件适宜。结果发现，两者的病毒侵染成功率都在 90% 左右，出现光漂白的植株在 80% 以上。两者光漂白现象的出现都是在接种 BSMV:PDS 后第 5-8 d，最开始是一些病毒斑和条纹，在随后的几天中不断发展成较明显的光漂白区域。在 15 dpi 左右出现了明显的光漂白现象，而对照组中无此类变化（图 9，图 10）。

从图 10 中不仅可以看出光漂白现象在旗叶中的变化，还可以看到，病毒在植株上的转移，以及由于转移引起的光漂白现象在穗部的发展。如图 10 所示，在接种后第 20 d，旗叶中的病毒已经向下转移，并使旗叶的叶柄发生了光漂白；与此同时在其穗部也观察到明显的光漂白现象，在 25 dpi 左右光漂白程度最大，而此时观察到旗叶下方的叶片仍然正常。

通过摩擦法接种小麦穗部和旗叶的比较，本研究认为对于小麦穗部基因的研究来说，选择摩擦法直接接种穗部更优。一是 BSMV 的病毒从叶子向穗部转移需要一定的时间，而直接摩擦穗部对于基因沉默来说更直接有效，节省时间并且省去不必要的麻烦。此外，旗叶对于小麦的发育和灌浆具有重要的意义，而摩擦旗叶接种 BSMV 会给旗叶带来一定的损伤，如机械损伤、病毒毒害等。因此，最好的方法是既能研究目的基因的功能，又不会引起植株的损伤，保持植株健壮的良好生存状况。

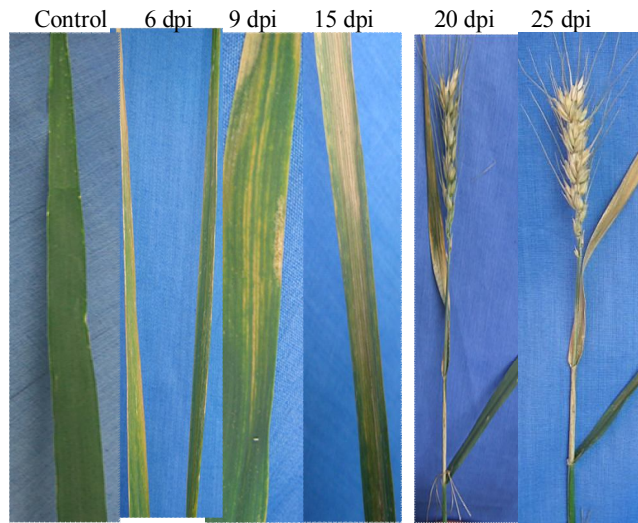


图10 在小麦旗叶沉默*PDS*基因

Fig. 10 Silencing of the *PDS* gene in flag leaves.

依次是对照、接种BSMV:PDS 6 dpi、9 dpi、15 dpi、20 dpi、20 dpi叶片的表型变化；
The left was a control. The next four images show the development of photo-bleaching
at 6 dpi、9 dpi、15 dpi、20 dpi with BSMV:PDS.

3.1.6.3 温度对基因沉默的影响

温度对接种后小麦的生长发育非常重要，也是影响基因沉默的一个重要因素。采用摩擦法接种抽穗期的小麦穗部和旗叶后（各 20 株），分别将其置于不同的温度环境中，21-24℃和 26-29℃，各 10 株。结果发现，在 21-24℃和在 26-29℃环境中的植株的病毒侵染成功率均在 90%左右。但不同的是，在相对较高温度下，病毒发展过快，症状过重，掩盖了基因沉默的光漂白表型，并且发生了其他的病害（白粉病），严重影响了基因沉默表型的观察（图 11）。此外，在 26-29℃环境下的植株灌浆和结实受到影响大大高于 21-24℃环境下的植株，存在灌浆不充分（图 12）和不能结实的现象，这对于要研究与淀粉合成有关的酶的基因功能是不利的。

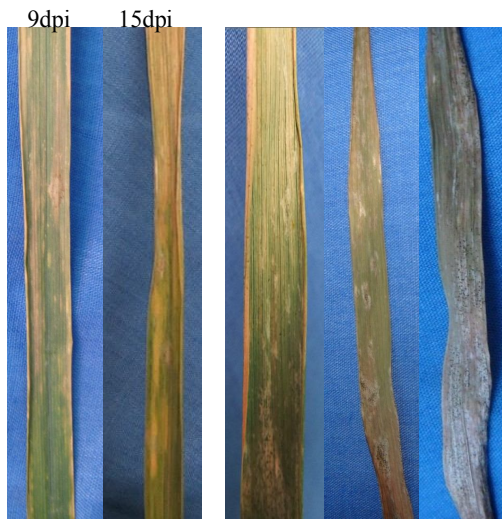


图 11 接种 γ -PDS 后在 26-29°C 的表型。

Fig. 11 The phenotype on leaves at 26-29°C.

注: 左二图 BSMV 症状过重; 右三图叶片病害严重。

Left three: BSMV symptoms overweight. Right three show serious diseases.



图 12 温度对籽粒灌浆的影响 (收获后)

Fig. 12 The impact of higher temperatures.

注: 26-29°C 温度下对部分籽粒灌浆的影响 (左) 及 21-24°C 下正常籽粒 (右)。

Abnormal seeds at 26-29°C (Left); normal seeds at 21-24°C.

此外, 本实验还就接种次数对基因沉默的影响进行了比较。即将在 21-24°C 条件下已经用过摩擦接种的穗和旗叶在 3 dpi 后在进行一次相同的接种。结果显示, 除在侵染成功率上有所提高外 (接近 100%), 其他并无明显变化。说明基因的沉默并不能通过多次接种而进行累加。接种次数的不同对 VIGS 的影响较小。

3.1.6.4 小麦叶绿素和类胡萝卜素含量的测定及 *PDS* 基因的实时荧光定量 PCR 检测。

为了验证小麦穗部的光漂白现象是由于叶绿素的缺失造成的, 选取各时期出现光漂白植株的小穗及相应时期的对照组测定其内源叶绿素及类胡萝卜素的含量。结果显示, 各植株的叶绿素含量和类胡萝卜素含量较对照相比均有明显的变化, 且变化趋势与小麦光漂白表型的发展规律相一致。其中, 叶绿素 a 及类胡萝卜素的含量均在 20 dpi 前后出现最大差异。叶绿素 a 的含量在这一时期下降了 83.6%, 而类胡萝卜素的减少量达到了 91.4%。叶绿素 b 的含量下降时期出现的更早, 在接种后 12-20 d 之间, 其含量减少均在 60% 以上。在 20 dpi 前后, 叶绿素总含量减少达到了 80.5% (图 13)。

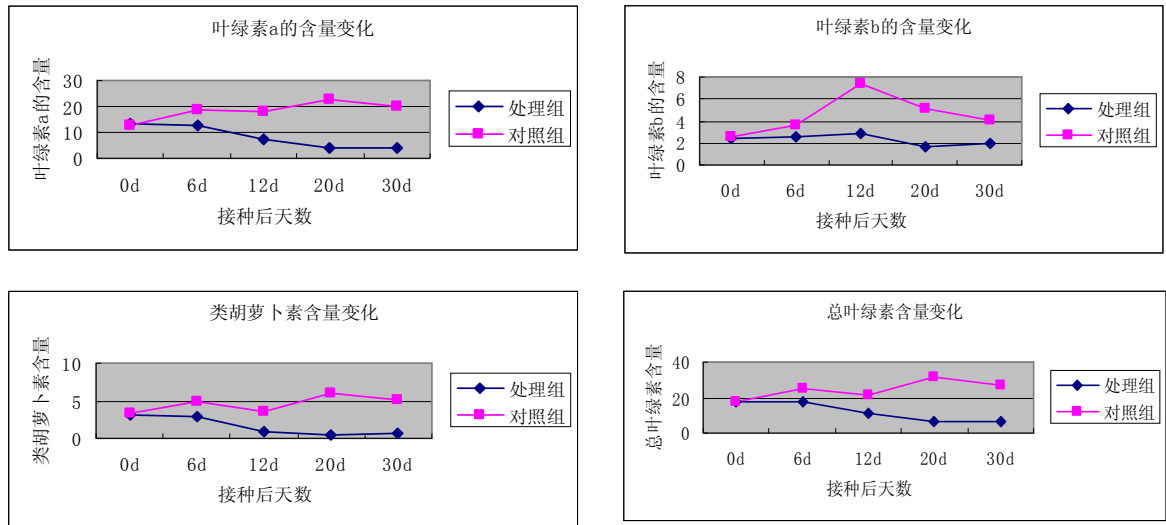
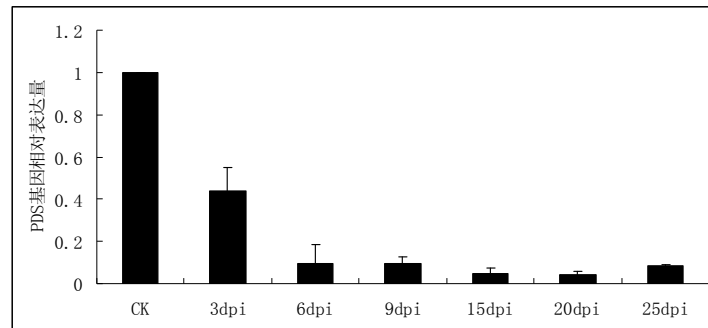


图 13 色素含量的变化

Fig. 13 Changes in pigment content

为了确定这些光漂白的发生是由于该 VIGS 体系诱导的 *PDS* 基因沉默引起的, 本研究对出现光漂白现象的小穗进行了实时荧光定量 PCR 测定以检测 *PDS* 基因转录本的表达水平 (图 14)。结果显示, 相对于对照组, 接种 BSMV:*PDS* 的植株在第 3 dpi 就检测到 *PDS* 基因相对表达量的下降, 其表达量下降了 50%左右。在第 9-15 dpi 其 *PDS* 基因的相对表达量下降了 90%左右。直到第 20 dpi, *PDS* 基因相对表达量都一直维持在一个相对较低的水平。在第 25 dpi 之后它的相对表达量才有所上升。

图 14 *PDS* 基因沉默的实时定量 PCR 检测Fig 14 Analysis of *PDS* gene silencing detected by real time-PCR

通过以上不同处理的比较及相关色素含量明显降低的变化趋势分析, 采用摩擦法在小麦抽穗期的穗部实施 BSMV-VIGS, 并在 21-24°C 环境下培养是利用 BSMV-VIGS 研究与淀粉合成相关基因功能的最优体系。

3.2 在小麦穗部诱导 *SBE IIb* 基因沉默的研究

在利用 BSMV-VIGS 体系成功沉默小麦内源 *PDS* 基因, 建立优化的体系后, 本研究尝试利用该技术沉默一个与小麦淀粉合成有关的酶-淀粉分支酶 *SBE IIb*, 以研究其在淀粉合成过程中的功能以及对直链淀粉和抗性淀粉合成的影响。

3.2.1 小麦 *SBE IIb* 基因的克隆和测序

根据小麦 *SBE IIb* 基因设计的特异引物性进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳结果显示, 目的基因片段大小正确, 条带清楚 (图 15)。DNA 胶回收试剂盒回收的电泳产物和 pMD19-T Vector 进行连接, 转化大肠杆菌 Top10。菌液 PCR 将阳性克隆提取质粒进行酶切验证。*Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切结果表明, 目标条带大小正确 (图 16), 说明 *SBE IIb* 基因片段已连接到 pMD19-T Vector 载体上。测序结果经 Blast 对比显示: 获得一条通读的重组基因片段, 其中克隆的 *SBE IIb* 基因片段长 181 bp。序列为: ATATTAATTAAGGTCAGTTGGGCAGTTAGGTTGGATCCGATCCGGCTGCGGCGGC GGCGACGAGATGGCGTCGCCGGCATTTCGCAGTTTCCGCGGGCCTCGCCGGC CGTCGGCTCCTCGATCCGGCGGGCCAGAGCGGAGGGGGCGCGGGGTGGAGCTGC AGTCGCCATCGCTGCTCTTCGGCCGCAA。序列分析表明: *SBE IIb* 基因片段与 GenBank 中登录的 *SBE IIb*(AY740401.1) 序列同源性为 97%, 并命名为 pMD19-SBE II b。

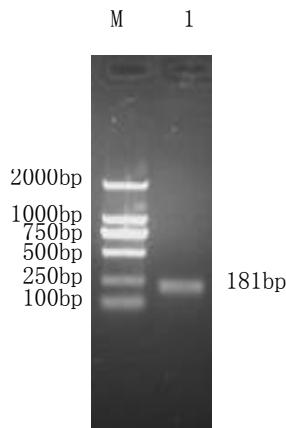


图 15 *SBE IIb* 基因片段的 PCR 电泳图

Fig. 15 PCR amplification products of *SBE IIb* gene by agarose gel electrophoresis
注: M:DNA 标准分子量; 2. *SBE IIb* 的 PCR 产物;
M: The DNA Marker. 1 PCR products of *SBE IIb*

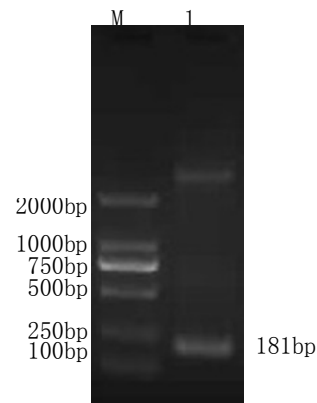


图 16 pMD19-SBE II b 质粒酶切验证

Fig. 16 The double digestion of pMD19- *SBE IIb*
注: M:DNA Marker; 1. pMD19-*SBE IIb* *Pac I/Not I* 酶切
M: The DNA Marker. 1 The double digestion of pMD19-*SBE IIb*

3.2.2 VIGS重组载体的构建

分别提取 pMD19-SBE II b 及 γ -PDS 载体的质粒, 通过 *Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切后胶回收目的基因片段和 γ -PDS 载体的大片段部分。将带有 *Pac I* 和 *Not I* 酶切粘性末端的 *SBE IIb* 基因片段与同样带有 *Pac I* 和 *Not I* 酶切粘性末端的 γ -片段进行连接, 转化感受态大肠杆菌 Top10。菌液 PCR 阳性的克隆提取质粒进行酶切验证。*Pac I* 和 *Not I* 两次单酶切结果表明, 目标条带大小正确 (图 5), 确定各目的基因片段已经连接到 γ 载体上, 说明成功构建了 γ -SBE II b 的 VIGS 重组载体。

3.2.3 VIGS载体的线性化与体外转录

VIGS 载体的线性化与体外转录方法分别同 3.1.4 和 3.1.5。结果见图 17, 图 18。从图中可以看出, 载体已完全被线性化, 且体外转录结果良好, 可以用于接种试验。

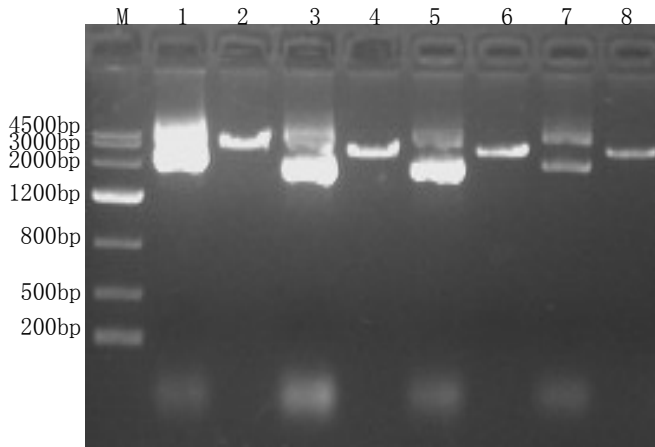


图 17 BSMV 质粒的线性化

Fig. 17 linearized plasmids of BSMV

M: DNA标准分子量; 1, α ; 2, 线性化 α ; 3, β ; 4, 线性化 β ; 5, γ ; 6, 线性化 γ ; 7, γ -SBE II b; 8, 线性化 γ -SBE II b。
M: DNA ladder; 1, α ; 2, linear α ; 3, β ; 4, linear β ; 5, γ ; 6, linear γ ; 7, γ -SBE II b; 8, lineary-SBE II b;

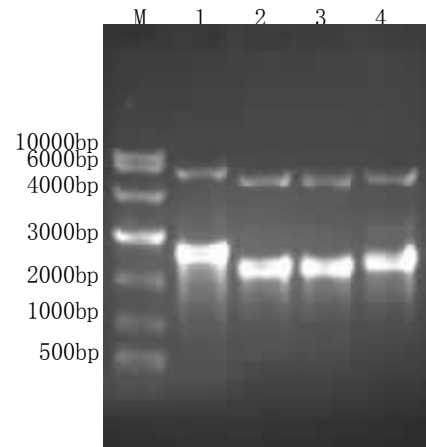


图 18 重组载体的体外转录

Fig. 18 Recombinant vector for in vitro transcription

注: M DNA Marker; 1. α ; 2. β ; 3. γ ; 4. γ -SBE II b;
M DNA Marker; 1. α ; 2. β ; 3. γ ; 4. γ -SBE II b

3.2.4 *SBE IIb*基因相对表达量的检测

在小麦抽穗期, 利用上述小麦穗部优化体系将BSMV:SBE II b载体转录的侵染性RNA摩擦接种10株小麦幼穗。在接种后6 d, 9 d, 12 d, 15 d和20 d分别提取侵染成功的麦穗籽粒的总RNA, 对其中的*SBE IIb*基因的转录本含量进行实时荧光定量PCR检测。结果显示, 与对照相比, 接种成功植株穗籽粒中的*SBE IIb*基因的相对表达量均有明显的下降。其中*SBE IIb*基因相对表达量在6 dpi就出现了明显的下降, 其含量仅为对照组的49%, 到第12 dpi相应的值下降为43.8%, 而到第20 dpi *SBE IIb*基因的相对表达量仅为对照组的5%左右(图19)。

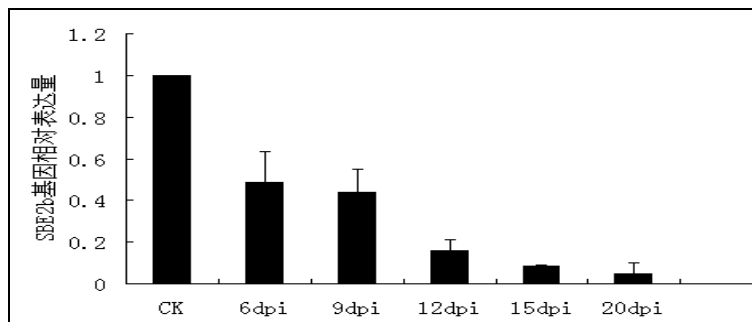


图 19 *SBE IIb* 基因相对表达量

Fig. 19 Transcript level of *SBE IIb*

注: CK. 对照。 CK The control

3.2.5 直链淀粉和抗性淀粉含量的测定

本研究又分别测定了其籽粒中直链淀粉和抗性淀粉含量。结果如下表所示, 接种BSMV:SBE II b的植株的籽粒的直链淀粉含量增加了10.21%(表3), 抗性淀粉含量升高了11.45%(表4), 较对照有上升, 但没有达到显著水平。

表 3 直链淀粉含量变化
Table 3 Content of Amylose

直链淀粉含量 (%)	重复1	重复2	重复3	平均
对照组	15.317	15.927	17.756	16.333 ± 1.423a
处理组	17.268	17.512	19.22	18.000 ± 1.22a
增加量 (%)	12.74	9.95	8.25	10.313 ± 2.427

表 4 抗性淀粉含量变化
Table 4 Content of Resistant starch

抗性淀粉含量 (%)	重复1	重复2	平均
对照组	1.651	1.685	1.668 ± 0.017a
处理组	1.837	1.880	1.859 ± 0.022a
增加量 (%)	11.27	13.39	12.33 ± 0.18

第四章 讨论与结论

目前传统的植物基因功能的研究方法有化学诱变、农杆菌介导的 T-DNA 转座子、RNAi 技术等。但是这些研究方法存在一定的局限性, 比如研究周期长、需要遗传转化且转化效率低等缺点, 从而限制其快速、高效的应用于植物基因功能的研究。近年来发展起来的利用病毒诱导基因沉默 (VIGS), 是一种转录后基因沉默技术, 是植物抵御外来病毒入侵的一种机制。由于具有快速、高效、高通量等明显优点, 使得其很快成为植物功能基因组研究的首选技术手段 (Burch-Smith 等, 2004; Bouché 等, 2001; Benavente 等, 2011)。VIGS 在禾本科植物中的应用虽然只有短短十年的时间, 但其研究的基因已涉及到包括植物生长发育、抗病虫、抗干旱、品质改良等众多方面 (李淼淼 等, 2013)。八氢番茄红素脱氢酶是在光合作用过程中类胡萝卜素合成的关键酶。类胡萝卜素在植物中具有光保护作用, 该基因沉默会引起沉默区域失绿, 因此在 VIGS 实验中常用作指示基因 (Sahu 等, 2004; Cakir 等, 2001; Kuzuoglu-Ozturk 等, 2011)。本研究所构建载体中的 *PDS* 基因片段参考 Holzberg 等 (Holzberg 等, 2002 的引物设计而来, 属于小麦内源基因, 已经验证能有效的沉默内源 *PDS* 基因。

本研究在体外转录方面与 mMES-SAGE mMachine High Yield Capped RNA Transcription kit 给出的方法相比, 在模板处理方面有改进, 改进的方法耗时更少, 操作更简便、高效。改进的方法与 ambion 公司所给的方法相比, 整合了 RNA 酶孵育处理和细胞裂解步骤, 省略了 SDS-蛋白酶 K 孵浴处理步骤, 这样降低了引入新杂质的风险, 因此在保证模板质量的同时, 减少了珍贵线性化模板的损失, 降低了实验成本, 节省了时间和精力。

在摩擦接种法的实验中, 难免存在有些部位没有接触到病毒接种液或浓度不均匀等问题, 同时病毒的发展也需要一个过程, 因此可能会导致病毒在穗部的发展情况不均一。而所提取的 RNA 是以半穗或若干小穗为材料, 因此不能排除由于穗部的某些区域未能感染病毒而对实验结果有干扰。因此, 在漂白区域的细胞中 *PDS* 基因的转录本比检测到的要低, 这一点, 随着时间的延长、漂白区域的扩大而基因表达量有所下降也可以说明。

本研究探索了利用 BSMV-VIGS 技术在小麦上进行 *PDS* 基因沉默的相对最优条件, 并利用此体系对与小麦粉合成有关的淀粉分支酶 *SBE IIb* 基因的功能进行了初步的研究, 并测定了其对小麦直链淀粉和抗性淀粉合成的影响。

4.1 影响 BSMV-VIGS 的因素

影响 BSMV-VIGS 体系诱导基因沉默的因素有很多, 如植株的生长状况、病毒转染后的共培育条件如温度、湿度、土壤、生物环境等等, 接种部位、接种量、接种方法、接种时间及接种液浓度和病毒载体中插入的目的片段等。但概括起来, 影响 BSMV-VIGS 实施的因素只有三个方面: 植株即寄主因素、病毒即载体因素、操作即人为因素。

4.1.1 寄主因素

在影响病毒诱导的基因沉默的因素中, 寄主无疑是一个重要的因素, 其中主要是指

寄主即被侵染植株的生长状况。植株的生长状况受许多因素的影响，其影响的时间跨度可能从选种种植一直到最后的收获。影响植株生长状况的因素有很多，如品种、温度、湿度、土壤、病虫害等。如前所述病毒诱导基因沉默的机制是植物抗逆反应(Ratcliff 等, 2001)。当健康健壮的植株受到病毒侵害时，能更快更有效的引发体内的抗病毒反应，从而更有效地激发 VIGS 反应。马猛等(马猛 等, 2010)在试验中发现，当长势较弱的植株受到病毒转染时，植株会出现死亡的表型，所以寄主的状况对病毒诱导的基因沉默具有重大的影响。因此，在实施 VIGS 技术前，需要培育出足够健壮的植株。但是，这并不是说一定要一直给植株提供最适宜的生长环境，因为还要考虑植株和病毒的互作关系。在实施 VIGS 前应给植株提供最适宜的生长条件，使其达到最好的状态。但当接种工程病毒载体后，就要同时考虑病毒的生长状况，需要两者平衡。既要使植株足够健壮，又要给病毒提供一个适宜的发挥作用，便于研究的条件。温度过高或过低，病毒或植株的生长过快或过慢都不利于利用 VIGS 进行基因功能的研究。

在本实验中，考虑到了温度对实验的影响。实验前为人工气候室中的小麦提供最佳的环境，如种子的消毒、土壤施肥、病虫害防治等，使植株达到一个最佳的状态。但当接种后分别将侵染的植株置于了 21-24℃ 和 26-29℃ 的环境中，以探讨 BSMV-VIGS-小麦体系的相对最适温度条件。结果表明，在较低的温度环境中，基因的沉默效果更好。在 26-29℃ 的环境中，病毒的发展过快，掩盖了基因的沉默表型，且容易滋生许多其他的病菌而严重影响研究的顺利进行。这与 Bennypaul 等(Bennypaul, 2012)，张立荣等(张立荣, 2011)的研究结论类似。

此外，由于小麦等单子叶植物组织的特有的结构，如秆节间中空，带形叶片叶肉薄等特点，使得在选择注射方法时而不进行考察，这也属于寄主因素对该体系的影响范围。

4.1.2 载体因素

目前，成功改造为载体应用于 VIGS 技术的病毒已有十多种，如烟草花叶病毒、马铃薯 X 病毒、番茄金色花叶病毒、烟草脆裂病毒、卫星病毒诱导的沉默系统、甘蓝缩叶病毒、玉米条纹病毒、大麦条纹花叶病毒以及小麦矮缩病毒等。对于不同的实验或寄主，都有合适的或最优的病毒载体可以应用，病毒载体的合适与否直接关系到实验成果的质量甚至是实验的成败。

影响载体作用效率的因素有很多，如病毒的毒性强弱、多克隆位点的位置以及插入的基因片段等。对于本实验来说载体的类型和结构已经确定，所以对于 BSMV-VIGS 诱导基因沉默来说，插入目的基因的片段的选择显得至关重要。目的基因的选择是利用 BSMV-VIGS 技术在小麦上实现有效沉默的基础和关键。目的基因的选择有两个很关键的问题，目的基因片段的位置区域和长度。VIGS 作用是基于序列同源性，同源性越高，基因沉默越好，85% 以上的同源性即可引起有效的基因沉默(Kumagai, 1995; Holzberg, 2002)。如果沉默某基因家族的单个基因，必须要选择非保守区域或非转录区(UTR)序列以防止沉默目的基因的同时沉默了未知的家族基因，反之可以选择高度保守区同时抑

制基因家族的若干成员 (Burch-Smith, 2004)。另外一个就是目的基因的长度选择。研究发现目的基因片段连续 23bp 完全相同就能引起目的基因沉默, 但是为了能有效实现基因沉默在实验中常常需要选择数倍于 23nt 目标基因片段 (Ratcliff, 1997)。同时需要注意如果选择的片段太长, 可能会导致病毒不能在植物体内传播或片段丢失。本研究所构建载体中的 *PDS* 基因片段参考 Holzberg 等 (Holzberg 等, 2002) 的引物设计而来, 属于小麦内源基因, 已经验证能有效沉默内源 *PDS* 基因。其与 Gene bank 中登录的 *PDS* 基因 cDNA 的同源性达到 97%, 说明所选择的片段有高度的保守性, 且 184 bp 的长度远远大于 VIGS 技术有效沉默目的基因的理论最低长度。实验结果表明, 插入该片段的载体成功地沉默了小麦内源 *PDS* 基因, 本研究分别从表型, 叶绿素水平, 和 RNA 分子水平对上述结果进行了印证。这样的结果也与前人的研究结果相似 (Holzberg 等, 2002; Scofield 等, 2005)。*SBE IIb* 基因片段的选取遵循同样的原则, 实验结果表明, 构建的两个载体均实现了内源基因的沉默。

4.1.3 人为因素

在任何实验中, 最关键的因素就是人, 即实验者的素质、思路、创新精神等。

而在本实验中影响实验的人为因素主要是接种部位、接种量、接种方法及接种时间的选择。其中, 为了研究与小麦灌浆期间与淀粉合成有关的基因, 本研究把接种时间选择在抽穗期。另外的几个因素对 BSMV-VIGS 小麦体系的影响程度是不确定的, 这也是本实验要讨论的重点。

接种方法、接种部位以及接种量的不同都会影响 VIGS 的效率。在小麦中目前常用的接种方法有摩擦法、注射法, 金属离子轰击法等。农杆菌介导的侵染方法在单子叶植物中还没有成功运用。对于穗部的基因功能的研究, 主要的接种部位是旗叶和穗部。研究发现, 接种量的不同只会影响接种的成功率, 而对于其他表现并无显著影响。但是对于接种的规模范围和程度要有一定的控制, 因为在增加范围和程度的同时, 对植物的损伤也会增加, 到达一定程度后可能会超出植株的承受能力。因此, 在试验中只要保持足够的接种量, 保证较高的接种成功率即可。Bennypaul 等研究发现在小麦孕穗期植株用手摩擦法接种 *PDS* 基因的 BSMV 重组载体后, 在小麦穗子上没有光漂白现象。而用无针头注射器在旗叶中脉处接种, 接种后 12-13 dpi 在穗子上发现比较明显的光漂白 (Bennypaul, 2012), 这与本实验的研究结果相似。但是本研究同时还发现, 注射法的接种成功率要远远小于摩擦接种, 且起效的时间要相对缓慢, 这可能是由于 BSMV 的工程病毒从注射部位转移至植株的系统穗需要一定的时间造成的。所以对于研究穗部基因的研究来说, 选择摩擦法直接接种更优。

对于接种部位, 实验表明, 无论是接种旗叶还是穗部, 都能有效的引起小麦内源基因的沉默。但不同的是, 对于穗部的沉默表型出现的时间看, 接种旗叶的植株病毒需要一个从旗叶到穗部的转移过程 (如图 10 右二)。摩擦旗叶会给旗叶带来一定的损伤如机械损伤、病毒毒害等, 对于小麦的发育和灌浆不利。但摩擦穗部则不存在这样的现象, 因为病毒从穗部向下面的叶片转移比从叶片向穗部转移要困难的多。因此, 接种穗部对

于利用 VIGS 研究穗部基因功能更优,既能快速研究穗部的基因功能,又能避免对植株造成不必要的损伤。

4.2 BSMV-VIGS 诱导 *SBE IIb* 基因沉默

在获得相对较优的 VIGS 体系后,本研究利用该体系对 *SBE IIb* 基因进行了沉默,一是为了初步研究 *SBE IIb* 基因的功能,同时也是为了验证该体系的有效性。

实验结果表明,本研究构建的 *SBE IIb* 基因的 BSMV 重组载体成功的沉默了小麦内源的 *SBE IIb* 基因。实时荧光定量 PCR 从分子水平对上述结果提供了佐证。但是在试验中发现,当利用实时荧光定量 PCR 技术检测接种 25 dpi 之后的植株的 *SBE IIb* 基因的转录本的相对表达量时,发现几次重复的结果差别比较大,即误差比较大,因此本研究对实验结果采取了舍弃的处理。可能的原因是,在接种 25 dpi 之后,植株已经接近完成灌浆,在植株灌浆的后期 *SBE IIb* 基因只是微量的表达,因此当检测结果的绝对值稍有偏差则有可能引起相对表达量产生数倍的误差,因此测定误差比较大。

在直链淀粉的含量方面,本研究的结果与 Regina 等 (Regina 等, 2006) 的研究结果相似。*SBE IIb* 基因的沉默并未引起直链淀粉和抗性淀粉含量显著性地变化。

4.3 BSMV-VIGS 应用展望

VIGS 技术与传统研究基因功能的方法相比具有快速、高通量、可避免植物遗传转化和插入突变、克服基因功能重复、能在不同遗传背景下发挥作用等优点 (Burch-Smith, 2004; Purkayastha, 2009)。同时它也存在一些局限性 (Burch-Smith, 2004; Purkayastha, 2009), 如诱导的靶基因不能 100% 沉默而未产生期望的表型变化、VIGS 诱导侵染植株内源靶基因的沉默不同步、植株间或实验间沉默表现水平不同、靶基因沉默后不能产生便于观察的表型以及沉默现象一段时间后会解除等。Zhang 等和 Vargason 等 (Zhang 等, 2007; Vargason 等, 2003) 的研究表明,病毒中编码的某些蛋白质含有能抑制 VIGS 发生,也许这是基因沉默现象会被解除的原因,但目前人们还不完全清楚其机制。

VIGS 作为一个高效的研究植物基因功能的手段,相信在不久的将来将会发挥更大的作用。但是目前其仍有需要改进的地方。结合上述对影响 BSMV-VIGS 因素的分析,笔者认为需要改进的方向有三个,即:载体方向、植株栽培方向和技术进步。一,目前可在小麦上应用的病毒载体较少,有效性和稳定性需要进一步的提高,且转录和接种技术步骤繁琐,要求复杂且严格,未来可能开发出更多,更有效,更方便的 VIGS 载体应用到小麦中。二,小麦基因组庞大,且不易培养,未来可能针对单子叶植物开发出模式之物,使得该类的研究周期更短,更具借鉴意义。三,相信在将来人们会有更好的思路,能够在单子叶植物的接种技术和接种方法上有所突破。

4.4 结论

本研究选择小麦 *PDS* 基因与淀粉合成关系较密切的 *SBEIIb* 基因为靶基因,以 *PDS* 基因为指示基因,以大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 为载体,插入目的基因片段,构建目的基因片段的重组表达载体,接种在小麦叶片和幼穗上,在不同温度条件、接种方法、接种量的处理条件下,诱发植物发生基因沉默,抑制 *PDS* 基因的表达,定性定量分析

基因沉默，建立相对最优的 VIGS 体系，并利用该体系进行了 *SBEIIb* 基因功能的初步研究，为以后开展小麦淀粉合成酶基因功能的研究提供了理论依据和技术指导。

1. 采用注射法和摩擦法分别侵染抽穗期的小麦穗部，接种的植株均在 5-8 dpi 出现明显的光漂白现象，在 15 dpi 光漂白现象明显扩大，在 23-26 dpi 光漂白程度最大。采用注射法接种的侵染成功率只有 20%，而摩擦法接种的侵染成功率为 90%。

2. 接种旗叶的表型变化与接种穗部的相似。由于基因沉默延迟，在接种旗叶 20 dpi 左右，穗部才观察到光漂白现象。

3. 26-29℃ 较高温度下培养，病毒发展过快，症状过重，掩盖了基因沉默的光漂白表型，并且发生了其他的严重病害，影响了接种材料表型观察及分子检测。因此，选择摩擦法接种小麦穗部，在 21-24℃ 培养更优。

4. 叶绿素 a 及类胡萝卜素的含量均在 20 dpi 分别下降 83.6% 和 91.4%。叶绿素 b 的含量在 12-20 dpi 减少超过 60%。在 20 dpi 前后，叶绿素总含量减少 80.5%。

5. 在接种后 3 d *PDS* 基因相对表达量下降了 50% 左右，在第 9-20 dpi，维持在一个相对较低的水平（约 10%），在 25 dpi 之后有所上升。

6. *SBE IIb* 基因相对表达量在 6 dpi 出现明显下降，其含量仅为对照组的 49%，到 12 dpi 相应值下降为 43.8%，到 20 dpi *SBE IIb* 基因的相对表达量仅为对照组的 5% 左右。与此同时，观察到接种 BSMV:*SBE IIb* 菌液的穗部籽粒直链淀粉含量增加了 10.21%，抗性淀粉含量增加了 11.45%，但均没有达到显著水平。

参考文献

1. 郭志鸿,张金文,王蒂,等.用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J].中国农业科学,2008,41(2): 494-501.
2. 李昌澎.小麦 S-腺苷甲硫氨酸代谢途径相关基因的抗旱节水功能分析[D].陕西:西北农林科技大学,2011.
3. 李加瑞,赵伟,李全梓,等.Waxy 基因的 RNA 沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降[J].遗传学报,2005,32(8): 846-854.
4. 李淼淼,南富波,刘伟,李卫华.VIGS在禾本科植物中的应用的进展[J].麦类作物学报,2013,33(2): 401-405.
5. 刘迪.小麦条锈抗病相关基因的分离和功能分析[D].北京:中国农业科学院,2008.
6. 吕山花,樊颖伦,吕福堂,等.大豆 GmPDS 基因的克隆及 VIGS 表达载体构建和鉴定[J].生物技术通报,2010,4: 122-124.
7. 马猛.大麦条斑花叶病毒(BSMV)诱导小麦穗部基因有效沉默体系的建立[D].陕西:西北农林科技大学,2010.
8. 聂凌鸿,王志芳.马铃薯抗性淀粉的制备及其性质[J].安徽农业科学,2007,35(16): 4928-4929.
9. 庞欢,王琳,李卫华,等.小麦抗性淀粉含量的遗传分析[J].遗传,2010,32(2): 170-176.
10. 宋伟杰,王峥,王利琳.利用病毒诱导的基因沉默技术研究一个豌豆 PI 同源基因的功能[J].科学通报,2007,52(14): 1644-1648.
11. 陶小荣,周雪平,崔晓峰,等.病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用[J].生物化学与生物物理学进展,2004,31(9): 777-783.
12. 王宏芝,李瑞芬,王国英,等.病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组学研究中的应用[J].自然科学进展,2005,15(1): 8-14.
13. 王琳,李卫华,庞欢,等.小麦高抗性淀粉相关分子标记的筛选与验证[J].《麦类作物学报》,2009,29(3): 390-395.
14. 王琳,银永安,王雪梅,等.抗性淀粉及其在春小麦种质资源中含量的测定[J].石河子大学学报(自然科学版),2008,26(2): 190-194.
15. 王自布.小麦籽粒淀粉生物合成及淀粉分支酶基因(*SBE-IIb*)的克隆与表达[D].新疆:石河子大学,2011.
16. 姚丹青,张薇薇,原丽华,等.VIGS:植物功能基因组学研究的革命[J].分子植物育种,2009,7(1): 155-161.
17. 张策,谢远红,罗云波,等.VIGS 诱导番茄果实 LeETR4 沉默及其对乙烯生成的影响[J].食品工业科技,2008,29(3) 125-130.
18. 张立荣.TcLr24 小麦抗叶锈病相关基因的分离与功能分析[D].河北:河北农业大学,2011.
19. 张宁宁.小麦蛋白激酶类基因及 TabZIP20 的功能验证[D].陕西:西北农林科技大学,2011.
20. 赵丹,赵继荣,黄茜,等.利用 BSMV-VIGS 技术快速分析小麦 TNBL1 基因的抗黄矮病功能[J].作物学报,2011,37(11): 2106-2110.
21. 赵法茂,齐霞,肖军,等.测定淀粉分支酶活性方法的改进[J].植物生理学通讯.2007, 43(6): 1167-1169.
22. Alan M M, Matthew K M, Aartha C J, et al. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal [J]. Plant Physiology, 2000, 122(4):989-997.
23. Assaad F F, Tucker K L, Singer E R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis

- [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 1067-1085.
24. Ball S, Guan HP, James M, et al. From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule [J]. *Cell*. 1996, 86(3): 349-352.
 25. Ball SG and Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54(3): 207-233.
 26. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
 27. Baulcombe D. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2: 109-113.
 28. Beatty MK, Rahman A, Cao H, et al. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch debranching enzyme from maize [J]. *Plant Physiol*. 1999, 119(1): 255-266.
 29. Bennypaul H S, Mutti J S, Rustgi S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2012, 12(1): 143-156.
 30. Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis THN, et al. The wrinkled seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch branching enzyme [J]. *Cell*. 1990, 60(1): 115-122.
 31. Bird AR, Flory C, Davies DA, et al. A novel barley cultivar (Himalaya 292) with a specific gene mutation in starch synthase IIa raises large bowel starch and short-chain fatty acids in rats [J]. *J Nutr*. 2004, 134(4): 831-835.
 32. Blauth SL, Kim KN, Klucinec J, et al. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (*sbe1*) in *Zea mays* L [J]. *Plant Mol Biol*. 2002, 48(3): 287-297.
 33. Blauth SL, Yao Y, Klucinec JD, et al. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn [J]. *Plant Physiol*. 2001, 125(3): 1396-1405.
 34. Buléon A, Gallant DJ, Bouchet B, et al. Starches from A to C. (*Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal [J]. *Plant Physiol*. 1997, 115(3): 949-957.
 35. Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants [J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(5): 734-746.
 36. Burton RA, Bewley JD, Smith AM, et al. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development [J]. *Plant J*. 1995, 7(1): 3-15.
 37. Campbell J, Li H. Silencing of multiple genes in wheat using barley stripe mosaic virus [J]. *Journal of Biotech Research*, 2010, 2:12-20.
 38. Cogoni C, Macino G. Post transcriptional gene silencing across kingdoms [J]. *Curr.OPin.Genetic Dev*. 2000, 10:638-643.
 39. Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1994, 65:205-209.
 40. Coudray C, Demigné C, Rayssiguier Y. Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans [J]. *The Journal of nutrition*, 2003, 133(1): 1-4.
 41. Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, et al. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos [J]. *Plant Cell*. 1998, 10(3): 413-426.
 42. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 543-553.
 43. Damager I, Olsen CE, Blennow A, et al. Chemical synthesis of methyl 6'- α -maltosyl- α -maltotriose and its use for investigation of the action of starch synthase II [J]. *Carbohydr Res*. 2003, 338(2): 189-197.
 44. Delrue B, Fontaine T, Routier F, et al. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally

- modified amylopectin [J]. *J. Bacteriol.* 1992, 174(11): 3612-362.
45. Denyer K, Clarke B, Hylton C, et al. The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules [J]. *Plant J.* 1996, 10(6): 1135-1143.
 46. Ding XS, Schneider WL, Chaluvadi SR, et al. Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(11): 1229-1239.
 47. Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, et al. Molecular structure of three mutations at the maize sugary1 locus and their allele-specific phenotypic effects [J]. *Plant Physiol.* 2001, 125(3): 1406-1418.
 48. Doehlert DC and Knutson CA. Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels [J]. *Plant Physiol.* 1991, 138(5): 566-572.
 49. Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, et al. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers [J]. *Plant J.* 1999, 17(3): 251-261.
 50. Edwards A, Marshall J, Sidebottom C, et al. Biochemical and molecular characterisation of a novel starch synthase from potato tubers [J]. *Plant J.* 1995, 8(2): 283-294.
 51. Edwards A, Vincken JP, Suurs LCJM, et al. Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in Pea [J]. *Plant Cell.* 2002, 14(8): 1767-1785.
 52. Ekengren S K, Liu Y L, Schiff M, et al. Two MAPK cascades NPR1 and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato [J]. *The Plant Journal*, 2003, 36(6): 905-917.
 53. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
 54. Flipse E, Keetels CJAM, Jacobsen E, et al. The dosage effect of the wildtype GBSS allele is linear for GBSS activity but not for amylose content: absence of amylose has a distinct influence on the physico-chemical properties of starch [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1996, 92(1): 121-127.
 55. Fontaine T, D'Hulst C, Maddelein ML, et al. Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin [J]. *J. Biol. Chem.* 1993, 268(3): 16223-16230.
 56. Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, et al. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity [J]. *Mol. Cell*, 2006, 21: 153-160.
 57. Fujita N and Taira T. A 56-kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seed in diploid wheat (*Triticum monococcum L.*) [J]. *Planta.* 1998, 207(1): 125-132.
 58. Fujita N, Yoshida M, Asakura N, et al. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice [J]. *Plant Physiol.* 2006, 140(3): 1070-1084.
 59. Fulton DC, Edwards A, Pilling E, et al. Role of granule-bound starch synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato [J]. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(13): 10834-10841.
 60. Gao M, Fisher DK, Kim KN, et al. Independent genetic control of maize starch-branching-enzymes IIa and IIb (isolation and characterization of a Sbe2a cDNA [J]. *Plant Physiol.* 1997, 114(1): 69-78.
 61. Gao M, Wanat J, Stinard PS, et al. Characterization of dull1, a maize gene coding for a novel starch synthase [J]. *Plant Cell.* 1998, 10(3): 399-412.
 62. Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, et al. SVISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32, 859-866.
 63. Guan HP, Kuriki T, Sivak M, et al. Maize branching enzyme catalyzes synthesis of glycogen-like polysaccharide in *glgB*-deficient *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92(4): 964-967.
 64. Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants [J]. *Science (Wash DC)*, 1999, 286: 950-952.

65. Hammond S M, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature (Lond)*, 2000, 404:293-296.
66. Hammond S M, Boettcher S, Caudy A A, et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science (Wash DC)*, 2001, 293:1146-1150.
67. Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, et al. Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37(4): 639-649.
68. Harvinder S, Bennypaul Jasdeep S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat [J]. *Funct Integr Genomics*, 2012, 12(1): 143-156.
69. Hirose T and Terao T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa L.*) [J]. *Plant*. 2004, 220(1): 9-16.
70. Holzberg S, Brosio P, Pogue G P, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(3): 315-327.
71. Hung PV, Maeda T and Morita N. Waxy and high-amylose wheat starches and flours-characteristics, functionality and application [J]. *Food science & Technology*, 2006, 17: 448-456.
72. James MG, Robertson DS and Myers AM. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels [J]. *Plant Cell*. 1995, 7(4): 417-429.
73. Jobling SA, Schwall GP, Westcott RJ, et al. A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum L.*) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A [J]. *Plant J*. 1999, 18(2): 163-171.
74. Kawalek A, Dmochowska-Boguta M, Orczyk W. A new BSMV-based vector with modified β molecule allows simultaneous and stable silencing of two genes [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2012, 17(1): 107-123.
75. Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(1): 91-100.
76. Kubo A, Fujita N, Harada K, et al. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm [J]. *Plant Physiol*. 1999, 121(2): 399-410.
77. Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(5): 1679-1683.
78. Kusaba M, Miyahara K, Lida S, et al. Low glutenin content 1: a dominant mutation that suppresses the glutenin multigene family via RNA silencing in rice [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1455-1467.
79. Lacomme C, Hrubikova K, and Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats [J]. *Plant J*. 2003, 34: 543-553.
80. Leloir LF, De Fekete MAR and Cardini CE. Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose [J]. *J.Biol.Chem*. 1961, 236:636-641.
81. Li Z, Chu XS, Mouille G, et al. The localization and expression of the class II starch synthases of wheat [J]. *Plant Physiol*. 1999b, 120(4): 1147-1155.
82. Li Z, Mouille G, Kosar-Hashemi B, et al. The structure and expression of the wheat starch synthase III gene: motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family [J]. *Plant Physiol*. 2000, 123(2): 613-624.
83. Li Z, Rahman S, Kosar-Hashemi B, et al. Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch synthase I [J]. *Theor.Appl.Genet*. 1999a, 98(8): 1208-1216.
84. Li Z, Sun F, Xu S, et al. The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants [J]. *Funct Integr Genomics*. 2003, 3(1-2): 76-85.

85. Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 297-307.
86. Liu H, Reavy B, Swanson M, et al. Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses [J]. *Virology*, 2002, 298(2):232-239.
87. Lu R, Malcuit I, Moffett P. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *The EMBO Journal*, 2003, 22: 5690-5699.
88. Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003. 30(4): 296-303.
89. Ma M, Yan Y, Huang L, et al. Virus-Induced Gene-Silencing in Wheat Spikes and Grains and Its Application in Functional Analysis of HMW-GS-encoding Genes [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 141.
90. MarieLouise A Heijnen, Paul Deurenberg, Johan MM Van Amelsvoort, et al. Replacement of digestible by resistant starch lowers diet-induced thermogenesis in healthy men [J]. *British Journal of Nutrition*, 1995, 73: 423-432.
91. Marshall J, Sidebottom C, Debet M, et al. Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers [J]. *Plant Cell*. 1996, 8(7): 1121-1135.
92. Martin C and Smith AM. Starch biosynthesis. *Plant Cell*. 1995, 7(7): 971-985.
93. Merai Z, Kerényi Z, Kertesz S, et al. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(12):5747-5756.
94. Morell MK, Blennow A, Kosar-Hashemi B, et al. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm [J]. *Plant Physiol*. 1997, 113(1): 201-208.
95. Muangsan N, Beclin C, Vaucheret H, et al. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants [J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(6): 1004-1014.
96. Myers A M, Morell MK, James MG, et al. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal [J]. *Plant Physiol*. 2000, 122(4): 989-997.
97. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, et al. Production of waxy (amylose free) wheats [J]. *Mol Gen Genet*. 1995, 248(3): 253-259.
98. Nakamura Y, Kubo A, Shimamune T, et al. Correlation between activities of starch debranching enzymes and α -polyglucan structure in endosperms of sugary- I mutants of rice [J]. *Plant J*. 1997, 12(1): 143-153.
99. Nakamura Y, Umemoto T, Satoh H. Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm. Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis [J]. *Physiologia Plantarum*. 1996, 97(3): 491-498.
100. Oikawa A, Rahman A, Yamashita T, et al. Virus-induced gene silencing of P23k in barley leaf reveals morphological changes involved in secondary wall formation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 22:1-9.
101. Palmer K.E, Thomson J.A, Rybicki E.P.. Generation of maize cell lines containing autonomously replicating maize streak virus-based gene vectors [J]. *Arch. Virol*, 1999, 144: 1345-1360.
102. Preiss J, Sivak M. Starch synthesis in sinks and sources. In *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops* [J]. New York: Dekker Glasgow: Blackie. 1996, pp.63-95.
103. Rahman A, Wong KS, Jane JL, et al. Characterization of SU I isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize [J]. *Plant Physiol*. 1998, 117(2): 425-435.
104. Rahman S, Bird A, Regina A, et al. Resistant starch in cereals: Exploiting genetic engineering and genetic variation [J]. *Journal of Cereal Science*, 2007, 46:251-260.
105. Rahman S, Regina A, Li Z, et al. Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the

- wheat genome donor *Aegilops tauschii* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(3): 1314-1324.
106. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants [J]. *Science*, 1997, 276(5318): 1558-1560.
107. Regina A, Bird A, Topping D, et al. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, 103(10): 3546-3551.
108. Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, et al. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus [J]. *Plant*. 2005, 222(5): 899-909.
109. Repellin A, Baga M and Chibbar RN. In vitro pullulanase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) Limit-dextrinase type starch debranching enzyme is modulated by redox conditions [J]. *J Cereal Sci*. 2008, 47(2): 302-309.
110. Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing [J]. *The Plant Cell Online*, 1998, 10(6): 937-946.
111. Ryoo N, Yu C, Park CS, et al. Knockout of a starch synthase gene *OsSSIIIa/Flo5* causes white-core flourey endosperm in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Rep*. 2007, 26(7): 1083-1095.
112. Satoh H, Nishi A, Yamashita K, et al. Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm [J]. *Plant Physiol*. 2003, 133(3): 1111-1121.
113. Scofield S R, Huang L, Brandt A S, et al. Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in Functional Analysis of the Lr21-Mediated Leaf Rust Resistance Pathway [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 2165-2173.
114. Smith AM and Martin C. Starch biosynthesis and the potential for its manipulation [J]. *Plant Biotechnology*, 1993, 3, 1-54.
115. Smith A M, Denyer K and Martin CR. What controls the amount and structure of starch in storage organs [J]. *Plant Physiol*. 1995, 107(3): 673-677.
116. Tabara H, Sarkissian M, Kelly W G, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1999, 9(2): 123-132.
117. Takeda Y, Guan HP and Preiss J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm [J]. *Carbohydr Res*. 1993, 240(24): 253-263.
118. Tallberg A. The amino-acid composition in endosperm and embryo of a barley variety and its high lysine mutant [J]. *Hereditas*. 1977, 87(1): 43-46.
119. Tang G L, Gad Galili. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application [J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22 (9) : 24 - 29.
120. Tetlow IJ. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement [J]. *Can. J. Bot*. 2006, 84(8): 1167-1185.
121. Topping DL and Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides [J]. *Physiol Rev*. 2001, 81(3): 1031-1064.
122. Thomas C L, Jones L, Baulcombe D C, et al. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(4): 417-425.
123. Umemoto T, Yano M, Satoh H, et al. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties [J]. *Theor. Appl. Genet*. 2002, 104(1): 1-8.
124. Van den Koornhuysen N, Libessart N, Delrue B, et al. Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *J. Biol. Chem*. 1996, 271(27): 16281-16287.
125. Van Eck L, Schultz T, Leach J E, et al. Virus-induced gene silencing of WRKY53 and an inducible

- phenylalanine ammonialyase in wheat reduces aphid resistance [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8: 1023-1032.
126. Várallyay É, Giczey G, Burgyán J, Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum* [J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(7): 1345-1350.
127. Vrinten PL and Nakamura T. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues [J]. *Plant Physiol.* 2000, 122(1): 255-264.
128. Wesley SV, Hellwiell CA, Smith NA, et al. Construct design for efficient, efficitive and high-thoroughput gene silencing in plants [J]. *Plant J.* 2001, 27(6):581-590.
129. Yamamori M and Quynh NT. Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat [J]. *Theor Appl Genet.* 2000, 100(1): 32-38.
130. Yamamori M, Fujita S, Hayakawa K, et al. Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylase [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(1-2): 21-29.
131. Ye F, Signer E R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93(20): 10881-10886.
132. Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, et al. mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen [J]. *Plant Cell.* 1998, 10(10): 1699-1711.
133. Zhao XC, Batey IL, Sharp PJ, et al. A single genetic locus associates with starch granule properties and noodle quality in wheat [J]. *J Cereal Sci.* 1998, 27(1): 7-13.

134. 作者简介

南富波，男，生于1989年3月，籍贯山东临沂。2011年毕业于山东轻工业学院（现齐鲁工业大学）食品与生物工程学院，获理学学士学位。同年考取石河子大学农学院作物遗传育种专业研究生，师从李卫华教授，研究方向为作物高产、优质、抗性性状的遗传育种。

在学期间主要参与的研究项目

参加了导师的国家自然科学基金资助项目《VIGS 诱导小麦淀粉合成基因沉默及对抗性淀粉合成的影响》（31160279）部分研究工作。

在学期间发表的文章

1. 南富波，李淼淼，王昊龙，刘伟，李卫华。小麦*PDS*基因VIGS载体构建体系的优化及验证[J]。麦类作物学报，2013，34（3）：285-291。
2. 南富波，李淼淼，王昊龙，韩俊杰，刘伟，李卫华。小麦*SBE IIb*基因的克隆及其与*PDS*基因串联VIGS载体的构建[J]。石河子大学学报（自然科学版），2014，32（1）：1-5。
3. 李淼淼，南富波，刘伟，李卫华。VIGS在禾本科植物中的应用的研究进展[J]。麦类作物学报，2013，33（2）：401-405。
4. 李淼淼，南富波，刘伟，李卫华。改良Trizol法从灌浆期小麦胚乳中提取高质量总RNA的研究[J]。新疆农业科学，2013，50（8）：1381-1385。
5. 李淼淼，南富波，刘伟，李卫华。小麦*SBE IIa*、*SS IIa*基因片段的克隆及VIGS重组载体的构建[J]。新疆农业科学，2013，50（11）：1961-1966。

致 谢

本论文是在导师李卫华教授和刘伟副教授的悉心指导下完成的。导师严谨的科研思路、敬业的精神、高度的责任感和奉献精神深深地触动了我，使我看到了自己的不足，并且老师耐心，细心地帮助和鼓励我克服这些不足，为我以后走上工作岗位打下了坚实的基础。李老师不仅在学业上给我以精心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀。借此机会，谨向李老师和刘老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

感谢育种教研室的各位老师在学习和实验上的指导和帮助；特别感谢绿洲生态实验室李艳军老师在实验室管理和实验中提供的无私帮助。齐军仓老师、孔广超老师、李召峰老师、李春艳老师、刘峰老师、刘永昌老师、薛飞老师在实验中给予了许多帮助，在此一并表示感谢。同时感谢李淼淼，王自布、冯宏杰、高欢欢、张晓磊、孙宏伟、李培培、何兰兰、朱双艳、李衡、赵彦朋、程文翰、王昊龙、张鸿、王接弟、韩俊杰等研究生在实验中给予的帮助。感谢其他楼层的实验室给予的热情帮助。

感谢我的家人对我学习的理解、支持和关心，他们的付出和期待是巨大的！感谢在背后默默支持我的亲朋好友，他们在精神上给予了我莫大的帮助。

最后，向论文评阅和答辩委员会的所有专家及在论文完成过程中提供过帮助的所有人员表示衷心的感谢！

石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

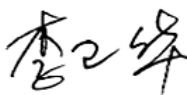
研究生姓名	南富波	学制	三年
专业	作物遗传育种	研究方向	作物高产、优质、抗性性状的遗传育种

学术评语:

小麦是中国最重要的农作物之一，改变淀粉的质量，高支链、高直链的淀粉无论在食品或是其它工业应用上都有着巨大的潜力。病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术是近年来发现的一种转录后基因沉默新技术，被认为在改良植物品质方面基因沉默技术被认为具有极大的应用价值，它可引起内源 mRNA 序列特异性降解，克服了许多传统方法难以克服的问题。

南富波同学的毕业论文选取小麦新春 11 号为研究材料，以大麦条纹花叶病毒(BSMV)为载体，利用病毒诱导基因沉默技术(VIGS)，采取不同接种方式、接种部位、接种量及培养温度，通过 VIGS 抑制对小麦八氢番茄红素脱氢酶(PDS)基因的表型观察、色素分析及 qRT-PCR 分析等，建立了小麦穗部相对最优的 VIGS 体系，并利用该体系进行了小麦淀粉分支酶 *SBEIIb* 基因功能的初步研究。研究结果为以后在小麦穗部实施 VIGS、改良淀粉品质提供了理论依据和技术指导。

该论文结构和研究方法合理，选题具有新颖性，研究内容密切结合小麦品质改良；该论文工作量大，内容丰富，试验数据准确，论文写作逻辑清晰，试验结论真实可靠。

指导教师签字: 
10年6月6日