

沉默基因 *OsHRG-7* 增强水稻对褐飞虱的抗性Silencing *OsHRG-7* gene enhances the resistance of rice to the brown planthopper *Nilaparvata lugens*

王静静 高庆 张月白 娄永根*

(浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

Wang Jingjing Gao Qing Zhang Yuebai Lou Yonggen*

(Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

转录因子 *OsERF3* 在水稻诱导抗虫反应中发挥着重要作用(Lu et al., 2011)。在前期研究中,通过酵母双杂交从水稻文库中筛选到与 *OsERF3* 互作的一个功能未知蛋白,其基因在 Gramene 数据库中的序列号为 Os11g0648400,将其命名为抗虫性相关基因 7(herbivore resistance-related gene 7, *OsHRG-7*)。本研究测定褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 为害水稻后 *OsHRG-7* 基因的表达情况,并利用分子生物学和反向遗传学等方法分析 *OsHRG-7* 基因在调控水稻防御褐飞虱中的作用,以明确 *OsHRG-7* 基因在水稻抗褐飞虱中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻及昆虫:水稻品种(品系)为秀水 110(xiushui110, XS110)、TN1 和以 XS110 为受体植物构建的 *OsHRG-7* 沉默水稻品系 R3、R9 和 R10,其中 XS110 和 TN1 种子由中国水稻研究所提供, *OsHRG-7* 沉默水稻品系种子由浙江大学转基因育种苗圃繁殖所得。种子洗净后置于直径 90 mm 的培养皿中清水浸泡 1 d,催芽 7~8 d 后,将稻苗移栽至装有水稻营养液(Yoshida et al., 1976)、长 40.8 cm、宽 30.5 cm、高 18 cm 的水稻种植框中,每框 72 株苗,置于温度(28±2)℃、光周期 14 L:10 D、相对湿度 60%~80% 的人工气候室内;25 d 后将苗单株移栽至装有水稻营养液、直径 8 cm、高 10 cm 的塑料杯中;恢复生长 3 d 后,水稻苗用于试验。褐飞虱自浙江大学实验农场捕获,置于(28±2)℃、光周期 12 L:12 D、相对湿度 50%~60% 的人工气候室中用感虫水稻品种 TN1 饲养。

试剂及仪器:MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒、PrimeScript RT Master Mix 反转录试剂

盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒,日本 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产分析纯。CFX96 Real-Time system 定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;SMZ445 体视显微镜,日本 Nikon 公司;带 48 个直径为 0.8 mm 小孔、直径 4 cm、高 8 cm、两端开口的圆筒形玻璃罩,江苏南通耀华玻璃仪器厂。

1.2 方法

基因 *OsHRG-7* 序列分析:利用 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>)和 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对 *OsHRG-7* 基因编码的氨基酸序列进行序列分析。

OsHRG-7 沉默水稻品系的鉴定:取单株种植 XS110 及 *OsHRG-7* 沉默水稻品系 R3、R9 和 R10 水稻苗,每株水稻基部罩上圆筒型玻璃罩,接入 10 头褐飞虱待产卵雌成虫。为害 0 h 和 12 h 时剪取稻株基部约 2~3 cm 叶鞘,置于液氮中研磨,称取约 0.1 g 粉末,参照试剂盒说明书提取 RNA 并反转录合成 cDNA。利用实时荧光定量 PCR 技术,以合成的 cDNA 为模板,选用内参基因 *OsACT* 正反向引物 ACT-F (5'-TGGACAGGTTATCACCATTGGT-3')/ACT-R (5'-CCGCAGCTTCCATTCCCTATG-3')和目的基因 *OsHRG-7* 正反向引物 HRG-7F (5'-ACTGAGGATGACCACCATGA-3')/HRG-7R (5'-GTCATAACTTCCTCGCCCAT-3')分别测定 XS110 和 *OsHRG-7* 沉默水稻品系 R3、R9 和 R10 中 *OsHRG-7* 基因的转录水平,以检测突变体的沉默效果。引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,每个处理重复 5 次。20 μL 实时荧光定量 PCR 反应体系:Premix Ex Taq II 10 μL、ACT-F/R 或 HRG-7F/R 各 0.8 μL、cDNA 1 μL、ddH₂O 7.4 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 30 s;

95℃变性5 s, 60℃退火延伸30 s, 共40个循环。使用5倍稀释系列梯度浓度的cDNA建立线性标准曲线, 由此计算不同品系中*OsHRG-7*基因的表达水平。

机械损伤处理后*OsHRG-7*基因相对表达量的测定: 取单株种植XS110水稻苗, 用40根直径0.32 mm的昆虫标本针制成针簇, 在水稻基部3 cm内叶鞘部位正、反两面各刺2次; 以未损伤的水稻作为对照。分别在机械损伤后0、0.5、1、2、4、8、12、24和48 h剪取损伤部位叶鞘和相应对照叶鞘, 每个处理重复5次, *OsHRG-7*基因转录水平测定方法同上。

褐飞虱为害处理后*OsHRG-7*基因相对表达量的测定: 取单株种植的XS110水稻苗, 每株接入10头褐飞虱待产卵雌成虫, 方法同上, 以未接褐飞虱的水稻为对照, 分别在为害后0、0.5、1、2、4、8、12、24和48 h剪取水稻受害部位叶鞘和相应对照叶鞘, 每个处理重复5次, *OsHRG-7*基因转录水平测定方法同上。

褐飞虱卵孵化率的测定: 取单株种植XS110及*OsHRG-7*沉默水稻品系R3、R9和R10水稻苗, 每株水稻苗上接入10头褐飞虱待产卵雌成虫, 方法同上。24 h后去除褐飞虱成虫, 每天观察记录各水稻苗上孵化的若虫数, 至无若虫孵化时, 剪取水稻苗于显微镜下计数未孵化卵的数量, 计算卵孵化率。每个水稻品种重复15次。

褐飞虱雌成虫产卵选择性的测定: 将1株XS110与1株*OsHRG-7*沉默水稻品系R3、R9和R10的水稻植株种植在同一个装有水稻营养液的塑料杯中, 2株苗间隔5 mm, 罩上同一个圆筒形玻璃罩, 接入15头褐飞虱待产卵雌成虫。接虫后48 h剪取水稻苗于显微镜下计数各水稻苗上卵的数量, 重复12次。

1.3 数据分析

使用SPSS Statistics 20.0软件对试验数据进行统计分析, 分别用独立样本*t*检验法和单因素方差分析进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *OsHRG-7*序列分析

*OsHRG-7*位于水稻第11号染色体上, 该序列含有4 187个核苷酸, CDS区含有1 032个核苷酸, 有7个外显子, 6个内含子。*OsHRG-7*编码一个由343个氨基酸组成的未知蛋白, 属于DUF3615未知蛋白家族。

2.2 *OsHRG-7*沉默水稻品系沉默效果的测定

不受褐飞虱为害时, R3、R9和R10三个水稻沉

默品系中*OsHRG-7*基因转录水平分别比XS110下降62.4%、85.7%和71.4%; 而当褐飞虱为害12 h后, 其分别比XS110下降77.4%、80.1%和93.3%, 说明沉默品系均具有良好的*OsHRG-7*沉默效果。

2.3 机械损伤和褐飞虱为害诱导*OsHRG-7*基因表达

机械损伤处理和褐飞虱为害均能在4 h时显著诱导*OsHRG-7*基因转录水平上升, 且*OsHRG-7*基因转录水平均在为害后12 h达到高峰, 分别比对照增加了2.52倍和3.67倍。

2.4 沉默*OsHRG-7*增强水稻对褐飞虱的抗性

沉默*OsHRG-7*基因显著降低水稻上褐飞虱卵孵化率, 沉默水稻品系R3、R9和R10上褐飞虱卵孵化率分别比XS110显著下降28.0%、31.3%和21.7%。沉默*OsHRG-7*基因显著降低褐飞虱雌成虫对水稻的产卵嗜好性, 褐飞虱雌成虫在沉默水稻品系R3、R9和R10上的产卵量均显著低于XS110, 分别是XS110植株上的59.4%、44.7%和59.5%。

3 讨论

茉莉酸、水杨酸、乙烯及过氧化氢信号转导途径在植物诱导抗虫反应中发挥着重要作用(Erb et al., 2012; 徐丽萍等, 2018)。如植食性昆虫为害植物往往引起植物体内茉莉酸含量上升, 进而导致防御化合物合成以及植物抗虫性增强。本研究结果表明, 褐飞虱雌成虫为害能迅速诱导水稻*OsHRG-7*基因转录水平上升, 并且沉默*OsHRG-7*基因能够显著降低褐飞虱卵孵化率和褐飞虱雌成虫对水稻的产卵嗜好性。沉默*OsHRG-7*基因引起水稻对褐飞虱抗性提高是否与这些防御相关信号途径的激活有关有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Erb M, Meldau S, Howe GA. 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5): 250–259
- Lu J, Ju HP, Zhou GX, Zhu CS, Erb M, Wang XP, Wang P, Lou YG. 2011. An EAR-motif-containing ERF transcription factor affects herbivore-induced signaling, defense and resistance in rice. *The Plant Journal*, 68(4): 583–596
- Xu LP, Li H, Lou YG. 2018. Research progress on early signaling events in plant-herbivore interactions. *Journal of Plant Protection*, 45(5): 928–936 (in Chinese) [徐丽萍, 李恒, 娄永根. 2018. 植物-植食性昆虫互动关系中早期信号事件研究进展. *植物保护学报*, 45(5): 928–936]
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd edition. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, pp. 7–83

(责任编辑: 张俊芳)