



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117210461 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202311138342.5

A01H 6/74 (2018.01)

(22) 申请日 2023.09.05

A01H 5/00 (2018.01)

(66) 本国优先权数据

A01N 57/16 (2006.01)

202310536583.9 2023.05.12 CN

A01P 3/00 (2006.01)

(71) 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72) 发明人 余心怡 渠慎春 林欣欣 曹丽芳

周亭亭 胡凯旭 李芳竹

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

专利代理师 傅婷婷 徐冬涛

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

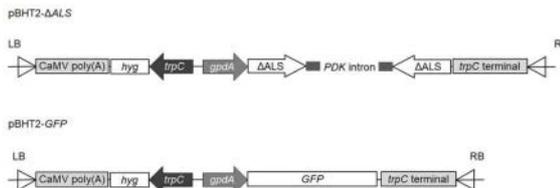
权利要求书1页 说明书10页
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

一种葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰和应用。抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质在防控葡萄座腔菌病害中的应用。利用RNAi真菌表达载体证实该基因的沉默影响葡萄座腔菌的致病性,能够用作病害防控的有效靶点。本发明所述葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰手段能够应用于植物抗病性改良或开发生物抗菌剂,实现葡萄座腔菌病害防控。



1. SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS作为靶点,在制备防控葡萄座腔菌病害的制剂中的应用,其特征在于,以乙酰乳酸合酶基因ALS作为靶点设计RNAi物质从而抑制葡萄座腔菌。

2. 抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质在防控葡萄座腔菌病害中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质选自针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA或者dsRNA。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA选自SEQ ID No.3或SEQ ID No.4所示miRNA的任意一条;所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段选自SEQ ID No.5-7中任一条所示的dsRNA。

5. 抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质在制备防控葡萄座腔菌病害的制剂中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质选自针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA或者dsRNA。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA选自SEQ ID No.3或SEQ ID No.4所示miRNA的任意一条;所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段选自SEQ ID No.5-7中任一条所示的dsRNA。

8. 一种防控葡萄座腔菌病害的制剂,其特征在于含有权利要求7中所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段。

9. 根据权利要求8所述的制剂,其特征在于所述的制剂为浓度为大于等于10ng/ μ L的dsRNA溶液。

一种葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰和应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术领域,涉及一种葡萄座腔菌关键基因及其应用,具体涉及一种葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰手段,还涉及所述乙酰乳酸合酶基因ALS的RNA干扰在葡萄座腔菌病害防控中的应用。

背景技术

[0002] 葡萄座腔菌*Botryosphaeria dothidea*,属于子囊菌门(Ascomycota),葡萄座腔菌科(*Botryosphaeriaceae*),葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)引起的苹果轮纹病(*Physalospora piricola* Nose)是全球范围内最具破坏性的苹果真菌病害之一,不仅损害果树枝干,引起枝条溃烂,降低果实品质,在极端情况下还会导致寄主死亡,对中国、日本、韩国、美国、澳大利亚和南非等世界主要苹果产区造成严重影响。这种病原菌也是引起木本植物溃疡病和枯萎病的最普遍和最重要的病原真菌,能够侵染来自24个不同属的植物物种,除苹果外,还危害梨、桃、葡萄、芒果、橄榄、杨树和桉树等多种果树和经济树种的安全生产。葡萄座腔菌对植物的侵染包含一段内生潜伏期,时常逃脱一般检疫措施,苹果轮纹病的病害监测耗时费力,所取得的效果仍然差强人意。另一方面,常规的依赖化学药剂的病害防治措施虽然能对苹果轮纹病起到一定的控制作用,但长期大量使用化学杀菌剂不仅增加生产成本,也给环境安全带来巨大的压力,还会引起真菌抗药性问题。因此,培育具有轮纹病抗性优良苹果新品系,开发针对葡萄座腔菌的绿色防控策略始终是苹果生产中亟需解决的问题。

[0003] 分子育种能够突破种间界限,缩短育种周期,提高育种效率,是目前发展最快的作物种质优化手段。在过去的几十年中,苹果种质抗轮纹病分子机制的研究已取得了实质性的进展,分离并鉴定出许多防御相关基因。通过基因工程将这些基因转入植物中,可以增强转基因植株的抗病性。但苹果作为木本植物,基因组高度杂合,遗传背景非常复杂,导入的外源基因可能无法起到预期的免疫效果,甚至改变苹果的其他农艺性状,对果实产量和品质产生不良影响。

[0004] RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种由非编码的小分子RNA(small RNA, sRNA)诱发的基因沉默现象,sRNA作用于具有序列互补性的目标mRNA,以直接剪切或翻译抑制的方式阻碍同源mRNA的表达。RNAi途径十分保守,几乎存在于所有真核生物中,植物和真菌都能通过内源sRNA诱导基因沉默。sRNA能够以裸露的分子、蛋白复合物或囊泡转运的形式在紧密接触的寄主和寄生物之间穿梭,诱发受体细胞基因沉默。基于sRNA双向运输的跨界RNAi是植物-病原菌互作过程中跨界基因表达调控的普遍机制。

[0005] 设计特异性靶向真菌关键基因的RNAi载体并引入真菌细胞,定向干扰目标基因的表达,通过跨界调控阻遏病原菌侵染,提高寄主的抗病性。基于跨界RNAi的防控策略能够有效控制常规栽培管理措施难以解决的植物病害,特别适用于潜伏性真菌病害。替代传统农药防治方法,能减少化学药物对环境的影响,同时避免病原菌耐药问题,是切实可行且应用前景广阔的环境友好型病害防治手段。已在许多不同的真菌病理系统中得到有效实践,成

功应用在小麦叶锈病和赤霉病、棉花黄萎病以及白粉病和灰霉病的防控上。

[0006] 虽然利用跨界RNAi的农业病害防治技术是本领域已知的,但是将该技术用于控制木本作物的真菌病害还未见报道。同时,影响该技术有效性的关键因素是选择适当的真菌目标基因,即真菌生长、增殖和毒力必需基因,其功能缺失将破坏真菌的致病性;设计针对真菌目标基因的sRNA干扰片段,能够在真菌体内高效触发目标基因特异性沉默;以及选用合适的手段诱导病原真菌摄取外源sRNA。对分离自苹果轮纹病的葡萄座腔菌的初步分析表明,其基因组富集有大量潜在致病蛋白的编码基因。然而,目前只有极少数基因的功能和作用机制得到进一步研究。作为最具经济影响的病原真菌之一,研究人员对葡萄座腔菌生长调控和致病机理的了解有十分限。

[0007] 乙酰乳酸合成酶(acetohydroxyacid synthase,AHAS,E.C.2.2.1.6,也简称为ALS)是细菌、真菌和高等植物的支链氨基酸(Branched-chain amino acid,BCAA)缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成途经的第一个关键酶,在植物病原真菌的生长、发育和毒力过程中必不可少。氯磺隆和三磺隆及其衍生物等磺酰脲类(SU)化合物等乙酰乳酸合酶抑制剂会改变ALS蛋白的催化活性,用作抗真菌药物能够有效遏制植物病原真菌的发展。

[0008] 编码ALS亚基的ILV_x基因缺失导致真菌BCAA营养缺陷,禾谷镰刀菌*F.graminearum*表现出气生菌丝生长抑制和红色素沉着,米曲霉*M.oryzae*分生孢子发生形态缺陷,大丽轮枝菌*V.dahliae*的微菌核形成破坏,对真菌致病性产生了严重的影响。

[0009] ALS催化支链氨基酸合成的生命过程不存在于哺乳动物,将ALS基因作为抗杂草和病原菌等有害生物的靶点对人体具有生物安全性。因此,本发明将乙酰乳酸合酶基因作为基于跨界RNAi的新型葡萄座腔菌病害防控策略的理想靶点。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种影响葡萄座腔菌致病性的乙酰乳酸合酶基因ALS,能够用作防控葡萄座腔菌病害的有效靶点。

[0011] 本发明的另一个目的是提供针对所述葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS的RNA干扰手段。

[0012] 本发明的第三个目的是将所述葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS的RNA干扰应用于植物抗性改良和生物抗菌剂,实现葡萄座腔菌病害防控。

[0013] 为实现上述目的,本发明的总体技术方案如下所述:

[0014] 本发明首先提供了一种葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;该基因编码的蛋白质序列如SEQ ID NO.2所示。

[0015] 本发明所述乙酰乳酸合酶基因ALS影响葡萄座腔菌的致病性。本发明针对ALS基因构建RNAi真菌表达载体,沉默高致病性葡萄座腔菌菌株LW347的所述乙酰乳酸合酶基因ALS。转化菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板,培养5天后,相比携带空载体的对照菌株GFP-hyg,ALS沉默菌株 Δ ALS-hyg表现出明显的生长缺陷。本发明用两种转化菌株侵染苹果叶片,接种48小时后,寄主病斑大小和病原菌生物量测定结果表明, Δ ALS-hyg菌株的定殖、扩繁能力和毒力都显著低于GFP-hyg对照菌株,初步证明乙酰乳酸合酶基因ALS与葡萄座腔菌的致病性有关。

[0016] SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS作为靶点,在制备防控葡萄座腔菌病害

的制剂中的应用,以乙酰乳酸合酶基因ALS作为靶点设计RNAi物质从而抑制葡萄座腔菌。

[0017] 抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质在防控葡萄座腔菌病害中的应用。

[0018] 作为本发明的一种优选,所述的抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质选自针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA或者dsRNA。

[0019] 作为本发明的一种优选,所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA选自SEQ ID No.3或SEQ ID No.4所示miRNA的任意一条;所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段选自SEQ ID No.5-7中任一条所示的dsRNA。

[0020] 抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质在制备防控葡萄座腔菌病害的制剂中的应用。

[0021] 作为本发明的一种优选,所述的抑制SEQ ID NO.1所示的乙酰乳酸合酶基因ALS表达的物质选自针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA或者dsRNA。

[0022] 作为本发明的一种优选,所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的miRNA选自SEQ ID No.3或SEQ ID No.4所示miRNA的任意一条;所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段选自SEQ ID No.5-7中任一条所示的dsRNA。

[0023] 一种防控葡萄座腔菌病害的制剂,其特征在于含有权利要求7中所述的针对所述乙酰乳酸合酶基因ALS的dsRNA干扰片段。

[0024] 作为本发明的一种优选,所述的制剂为浓度为大于等于10ng/ μ L的dsRNA溶液。

[0025] 本发明采用PEG介导的原生质体转化技术,将通过T7 RNA聚合酶体外转录获得的2个人工miALS或3个dsALS的miRNA/miRNA*或dsRNA,分别引入葡萄座腔菌菌株LW347。将转化菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板,培养5天后,与模拟转化的对照相比,转化不同RNA干扰片段的葡萄座腔菌的生长均受到不同程度的抑制;其中分别引入dsALS-1(SEQ ID No.5)和dsALS-2(SEQ ID No.6)的转化菌株表现出显著的生长缺陷,表明dsALS-1和dsALS-2对所述ALS基因的RNA干扰效果最为明显。

[0026] 本发明所述乙酰乳酸合酶ALS基因的RNA干扰手段能够运用于葡萄座腔菌病害防控,具体包括:(1)将所述ALS基因RNA干扰片段在寄主中表达以提高植物对葡萄座腔菌的抗病性;(2)将所述ALS基因RNA干扰片段作为活性物质,制备葡萄座腔菌生物抗菌剂。

[0027] 本发明所述乙酰乳酸合酶ALS基因的RNA干扰手段能够运用于提高植物对葡萄座腔菌的抗病性,包括以下步骤:(1)构建含有所述ALS基因RNA干扰片段的植物表达载体;(2)将所述植物表达载体转化到植物或植物细胞中;(3)筛选获得葡萄座腔菌抗性增强的转基因植物。

[0028] 本发明所述转化方案,以及将所述ALS基因RNA干扰片段引入植物的方案可视用于转化的植物或植物细胞的类型而变化。

[0029] 将所述RNA干扰片段引入植物细胞所使用的植物表达载体包括:hpRNA干扰载体和病毒介导的基因沉默(Virus Induced Gene Silencing,VIGS)载体。构建含有所述ALS基因RNA干扰片段的植物表达载体的方法为本领域技术人员所熟知。

[0030] 将所述植物表达载体引入植物细胞的合适方法包括:显微注射、电穿孔、农杆菌介导的转化和直接基因转移等。

[0031] 本发明所述植物包括:葡萄座腔菌的寄主植物,优选为园艺和经济作物,包括但不

限于苹果、梨、桃、杨梅、葡萄、芒果、栗树、核桃、阿月浑子、桉树、杨树、桤木或桃金娘中的任意一种或多种。

[0032] 本发明根据葡萄座腔菌转化菌株的表型变化,选择核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6所示的两个ALS基因RNA干扰片段,用于VIGS载体的构建。分别将上述两个DNA片段连接到烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus,TRV) pTRV2载体上,形成针对所述ALS基因的TRV-VIGS载体,导入农杆菌,与pTRV1配套用于苹果的渗透侵染,最终获得表达葡萄座腔菌ALS基因RNA干扰片段的TRV阳性苹果TRV-dsALS-1(表达RNA干扰片段dsALS-1,其核苷酸序列为SEQ ID No.5所示)和TRV-dsALS-2(表达RNA干扰片段dsALS-2,其核苷酸序列为SEQ ID No.6所示)。本发明进一步对表达所述ALS基因RNA干扰片段的TRV苹果进行葡萄座腔菌抗性评价。寄主症状分析结果表明,TRV-dsALS-1和TRV-dsALS-2苹果对侵染的敏感性显著低于渗透TRV空载的对照植株(TRV-00),病斑面积分别减小43.9%和61.2%。提取接种点为圆心直径2cm叶片的DNA进行真菌生物量测定,两种携带ALS基因RNA干扰片段的苹果的真菌生物量明显降低,仅为TRV-00对照植株的66.7和36.8%。表达量分析结果表明,TRV-dsALS-2和TRV-dsALS-3苹果接种部位的葡萄座腔菌ALS基因的表达量均明显降低,其中TRV-dsALS-2组内ALS基因的表达水平下降至TRV-00对照的40.6%。综合通过寄主症状分析、真菌生物量测定以及ALS基因表达量分析结果,可以得出TRV-dsALS-2(RNA干扰片段的核苷酸序列为SEQ ID No.6所示)苹果对葡萄座腔菌侵染具有更强的抗性,表明将dsALS-2(核苷酸序列为SEQ ID No.6所示)作为葡萄座腔菌ALS基因的RNA干扰片段在植物中表达,能够达到较好的干扰效果,能够有效提高植物抗病性。

[0033] 本发明所述乙酰乳酸合酶ALS基因的RNA干扰手段还能够应用于葡萄座腔菌生物抗菌剂,包括以下步骤:(1)合成所述ALS基因RNA干扰片段的dsRNA;(2)将所述dsRNA作为活性物质制备抗菌剂;(3)将含有所述ALS基因RNA干扰片段dsRNA的抗菌剂喷施于植物,以抑制葡萄座腔菌的侵染。

[0034] 合成本发明所述ALS基因干扰片段dsRNA的方法为本领域技术人员所熟知,包括:体外转录法、微生物发酵法和植物表达法。

[0035] 本发明采用基于T7 RNA合成酶的体外转录技术将所述ALS基因RNA干扰片段dsALS-1或dsALS-2(核苷酸序列为SEQ ID No.5或SEQ ID No.6所示)合成为dsRNA,用不含RNase的超纯水稀释为50ng/ μ L。本发明将所述dsRNA溶液涂布于PDA平板,待完全吸收后,用于培养葡萄座腔菌。接种于含有所述两种dsRNA的PDA平板5天后,与接种于超纯水(RNase-)处理的PDA平板的对照相比,葡萄座腔菌均表现出明显的生长缺陷。荧光定量PCR(RT-qPCR)分析表明真菌ALS基因表达水平显著降低,表明葡萄座腔菌能够摄取环境中的外源dsRNA,并诱发真菌目标基因沉默。

[0036] 本发明将所述ALS基因RNA干扰片段(核苷酸序列为SEQ ID No.5或SEQ ID No.6)的dsRNA溶液(50ng/ μ L)施加于苹果叶片表面,待风干后将葡萄座腔菌菌株LW347接种于施加部位。接种48小时后,施加两种ALS基因RNA干扰片段dsRNA溶液的接种部位症状明显轻于施加超纯水(RNase-)的对照部位,病斑面积减小至47.5%-69.4%,病原菌生物量显著降低,接种点为圆心,周边直径2cm叶片内的真菌生物量也显著降低至对照部位的53.8%-76.0%,表明所述ALS基因RNA干扰片段能够用作抗菌活性物质,抑制葡萄座腔菌对植物的侵染。

[0037] 本发明进一步用超纯水(RNase-)将所述核苷酸序列为SEQ ID No.6的ALS基因RNA干扰片段的dsRNA溶液稀释为25、10、5和1ng/ μ L,分别施加于苹果叶片表面,待风干后接种葡萄座腔菌菌株LW347。接种点周边直径2cm的真菌生物量测定结果表明,10ng/ μ L的dsASL-2溶液就具有一定的抗菌效果,但高浓度的dsRNA溶液的能够对植物起到更好的保护作用。

[0038] 本发明技术方案与现有技术相比,具有以下有益效果:

[0039] 本发明提供了一种乙酰乳酸合酶基因ALS,利用RNAi真菌表达载体证实该基因的沉默影响葡萄座腔菌的致病性,能够用作病害防控的有效靶点。设计并获得针对所述ALS基因的两个工程miRNA和三个dsRNA干扰片段,通过将所述干扰片段直接引入真菌,筛选出能够起到显著RNA干扰效果的干扰片段(dsRNA,其核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6所示)。进一步利用TRV介导的VIGS技术将核苷酸序列为SEQ ID No.5或SEQ ID No.6的RNA干扰片段引入苹果,获得ALS基因干扰植株。综合寄主症状鉴定、病原菌生物量测定和目标基因表达水平分析,明确干扰效果最好的RNA干扰片段,其核苷酸序列为SEQ ID No.6所示。本发明进一步将所述ALS基因RNA干扰片段制备为抗菌剂,并优选dsRNA溶液浓度为10ng/ μ L时即可起到抗葡萄座腔菌作用。本发明所述葡萄座腔菌乙酰乳酸合酶基因ALS及其RNA干扰手段能够应用于植物抗病性改良或开发生物抗菌剂,实现葡萄座腔菌病害防控。

[0040] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术及科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解相同的含义。

附图说明

[0041] 图1为ALS基因的RNAi真菌表达载体示意图。

[0042] 图2为ALS沉默菌株的鉴定。A.PDK intron和hyg的RT-PCR验证;B.ALS基因的表达水平鉴定。

[0043] 图3为ALS基因沉默葡萄座腔菌的表型鉴定。

[0044] 图4为ALS基因沉默葡萄座腔菌的致病性分析。其中,图A:寄主症状评价;图B:病原菌生物量测定。

[0045] 图5为引入不同ALS基因RNA干扰片段的葡萄座腔菌菌株LW347的表型鉴定。

[0046] 图6为引入不同RNA干扰片段的葡萄座腔菌的ALS基因表达水平分析。

[0047] 图7为用于TRV-VIGS的pTRV2载体示意图。

[0048] 图8为TRV阳性苹果植株的RT-PCR鉴定。其中,M:marker,WT:野生型。

[0049] 图9为表达ALS基因干扰片段的TRV苹果的抗病性评价。其中,图A:寄主病斑面积统计;图B:病原菌生物量测定;图C:真菌ALS基因表达水平分析。

[0050] 图10为葡萄座腔菌菌株LW347对环境中外源dsRNA的摄取鉴定。其中,图A:培养于含有ALS基因RNA干扰片段的PDA平板的真菌表型;图B:ALS基因表达水平分析。

[0051] 图11为ALS基因RNA干扰片段施加苹果叶片的抗菌效果评价。其中,图A:寄主症状鉴定;图B:病斑大小统计;图C:病原菌生物量测定;图D:真菌ALS基因表达水平分析。

[0052] 图12为不同浓度ALS基因RNA干扰片段dsRNA溶液的抗菌效果评价。其中,图A:寄主病斑大小统计;图B:病原菌生物量测定。

具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的,不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0054] 实施例1葡萄座腔菌ALS基因的鉴定(制备实施例1)

[0055] 1. ALS基因的分离与克隆

[0056] 1) 将葡萄座腔菌株LW347(分离自苹果轮纹病病株,由中国科学院郑州果树研究所周增强惠赠),接种于PDA平板,24℃下暗培养5天后,刮取菌丝并提取总RNA。真菌RNA抽提使用擎科生物TSINGKE的植物总RNA提取试剂盒(具体操作步骤见制造商的说明);

[0057] 2) 合成第一链cDNA

[0058] 以葡萄座腔菌总RNA为模板,使用PrimeScript反转录试剂盒(Takara),合成第一链cDNA。根据制造商的说明,首先去除基因组DNA,再使用试剂盒中提供的RT Primer Mix反转录。

[0059] 3) 扩增ALS基因的全长cDNA

[0060] 本发明中的乙酰乳酸合酶ALS与NCBI Genebank(National Center for Biotechnology Information,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的KAF4307733相对应。使用tBLASTn程序将其氨基酸序列与葡萄座腔菌基因组序列信息进行比对(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_011503125),获得ALS基因的序列信息。根据此序列信息,设计特异性引物,常规PCR扩增得到ALS基因的全程cDNA。所使用引物如下:

[0061] ALS F:ATGCAGCCTCACACAGTGG

[0062] ALS R:TCATGCCACGATAGCCTCCA

[0063] 通过Sanger测序得到ALS基因全长cDNA如SEQ ID NO.1中1-1809位碱基的核苷酸序列(序列总长度为1809bp),该基因编码如SEQ ID NO.2中所示的氨基酸序列(总长度为602nt)。也可以委托生物公司合成ALS基因全长cDNA。

[0064] 2. 构建葡萄座腔菌ALS基因沉默菌株

[0065] 以葡萄座腔菌第一链cDNA为模板,设计基因特异性引物(Δ ALS F:GGTACCAAGACATCCCCAACC; Δ ALS R:GGTTACGACGAGCGGGTG,利用常规PCR技术扩增得到葡萄座腔菌ALS基因的中间片段(308bp)。采用重叠PCR技术将正义和反义的中间片段连接在PDK intron两端,获得 Δ ALS片段,并将其构建入真菌表达载体pBHT2-GFP取代GFP基因,得到ALS基因的RNAi真菌表达载体pBHT2- Δ ALS(图1)。

[0066] 1) 提取葡萄座腔菌原生质体。①从PDA平板24℃暗培养5天的葡萄座腔菌LW347边缘挑取6块约3X 3mm²的菌丝块,接种于100mL PDB液体培养基中,24℃60rpm培养42小时。②常温下3000g离心10min去除培养基,用0.7M NaCl冲洗菌丝3次,用无菌滤纸吸干水分。③称取1g菌丝加入10mL崩溃酶(3%driselase,0.7M NaCl),28℃80rpm酶解3.5小时。④用三层擦镜纸过滤酶解液,将滤液4℃3000g离心10min收集原生质体。⑤用STC(1.2M sorbitol,0.01M Tris-HCl pH 7.5,0.05M CaCl₂)洗涤沉淀两次,重悬于STC并稀释至1X10⁶/mL,置于冰上保存。

[0067] 2) 葡萄座腔菌的遗传转化(下述真菌的转化仅仅用来验证ALS基因的功能,下述转

化菌株不是代代相传的生物材料)。①将pBHT2- Δ ALS重组质粒和pBHT2-GFP载体分别转化至农杆菌AGL1。②取500 μ L LB液体培养基(50 μ g/mL卡那霉素)中新鲜培养的农杆菌,加入诱导液体培养基(IM,MM(K₂HPO₄ 2.05g/mL,KH₂PO₄ 1.45g/mL,NaCl 0.15g/mL,MgSO₄·7H₂O 0.50g/mL,CaCl₂·6H₂O 0.1g/mL,FeSO₄·7H₂O 0.0025g/mL,(NH₄)₂SO₄ 0.5g/mL),40mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES),pH 5.3;10mM glucose,0.5% (w/v) glycerol,200 μ M Acetosyringone(AS)),28 $^{\circ}$ C培养5~6个小时至OD6000.5~0.6。③在100 μ L葡萄座腔菌原生质体中加入400 μ L恢复培养基(Yeast extract Peptone Sucrose,YPS,yeast extract 3.5g/L,peptone 5g/L,1M sucrose),25 $^{\circ}$ C培养2小时。④取100 μ L含有重组农杆菌的IM,加入200 μ L恢复培养的葡萄座腔菌原生质体,混合均匀涂布于覆盖玻璃纸的诱导平板(AIM,MM,40mM MES,pH 5.3,5mM glucose,0.5% (w/v) glycerol,200 μ M Acetosyringone(AS),Agar 1.5%),22 $^{\circ}$ C培养48h。⑤将AIM平板上的玻璃纸剪为宽0.5cm的条带,转移至筛选平板(PDA,hygromycin B 8mg/L,cefotaxime 60mg/L,streptomycin60mg/L)上,28 $^{\circ}$ C暗培养7天。⑥挑取新生菌丝,转移到含有10mg/L hygromycin B的PDA平板上,28 $^{\circ}$ C暗培养5天。

[0068] 3) 阳性菌株的鉴定。根据制造商的说明,使用天根TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒提取转化菌株的基因组DNA,RT-PCR鉴定转基因阳性菌株,结果见图2A,所用引物如下:

[0069] PDKintron F GCAATGAAAGACGGTGAGCTG

[0070] PDKintron R GGCATGATGAACCTGAATCGC

[0071] hyg F CGAGAGCCTGACCTATTGCAT

[0072] hyg R TCCGTCAGGACATTGTGGAG

[0073] 提取转化菌株的总RNA,反转录成为第一链cDNA,RT-qPCR鉴定转基因阳性菌株的ALS基因的表达水平,结果见图2B。所用引物如下:

[0074] ALS-q F CGATGTGGTGACGAATCAGGT

[0075] ALS-q R ACCTGTGATGCTGCATACGAA

[0076] 3. 葡萄座腔菌ALS沉默菌株的表型鉴定

[0077] 1) 真菌生长评价。将转化菌株接种于PDA平板,24 $^{\circ}$ C暗培养5天后,观察菌落形态。与GFP-hyg对照菌株相比,沉默ALS基因的 Δ ALS-hyg菌株表现出明显的生长缺陷,表明ALS基因沉默影响葡萄座腔菌的生长(图3)。

[0078] 2) 真菌致病性分析。取当年生枝3-4叶位的苹果叶片,用湿润的脱脂棉缠绕叶柄保湿。用针头在叶片表面扎一小孔,将转化菌株接种于伤口上,叶片正面向上于25 $^{\circ}$ C(保湿培养(16h光照/8小时暗)。接种48小时后,拍照记录叶片症状,并测量病斑大小。取接种点为圆心直径2cm的叶圆盘,测定病原菌的生物量(参见:Yu et al.,Malus hupehensis miR168 targets to ARGONAUTE1 and contributes to the resistance against Botryosphaeria dothidea infection by altering defense responses.Plant and Cell Physiology,2017,58(9):1541-1557.)。结果表明,苹果叶片上ALS基因沉默菌株接种部位的症状较轻,病斑面积约为对照菌株接种部位的37.4%,病原菌生物量显著降低,仅为对照菌株的31.5%。表明ALS基因对葡萄座腔菌的致病性起到重要作用(图4)。

[0079] 实施例2葡萄座腔菌ALS基因RNA干扰片段的筛选(制备实施例2)

[0080] 1) RNA干扰片段设计。根据SEQ ID NO.1所示的序列信息,设计针对葡萄座腔菌ALS

基因的两个工程miRNA和3个dsRNA干扰片段,即miALS-1和miALS-2 (SEQ ID NO.3-4) 以及dsALS-1、dsALS-2和dsALS-3 (SEQ ID NO.5-7) (表1)。两种21bp的miALS DNA片段由上海捷瑞合成获得,三种dsALS来源于ALS基因cDNA的不同区段,通过常规PCR手段获得。

[0081] 表1葡萄座腔菌ALS基因RNA干扰片段

名称	序列/引物	位置	片段长度
miALS-1	TAACGACACCTCGGGAGCTC	772-792	21 bp
miALS-2	TCCTGAACAGATACGTCGCTG	1175-1195	21 bp
dsALS-1	dsALS-1 F: GTCTGCACAATGCCTCTTCG	269-498	230 bp
[0082]	dsALS-1 R: GGTGCAGGACATGCGGAG		
dsALS-2	dsALS-2 F: ACATCCCCAACCAACCCG	386-645	260 bp
	dsALS-2 R: GCCGATGGTCTCGACGG		
dsALS-3	dsALS-3 F: GAAGGAGCGGATGGGGCTG	957-1203	247 bp
	dsALS-3 R: CCGCAGCGTCCTGAACAGA		

[0083] 2) 葡萄座腔菌遗传转化。采用PEG介导的原生质体转化技术,将上述RNA干扰片段引入葡萄座腔菌菌株LW347。①利用诺唯赞Vazyme的T7 RNAi Transcription Kit试剂盒,将上述ALS基因干扰片段在体外转录为miRNA/miRNA*或dsRNA,具体操作步骤参见制造商的说明。②采用实施例1所述方法提取葡萄座腔菌原生质体。③取1mL原生质体加入10 μ g上述miRNA/miRNA*或dsRNA,以及25 μ g pBHT2-GFP质粒,轻柔混匀,冰浴30min。④滴入1mL PTC (40%PEG4000,0.1M CaCl₂,0.1M Tris-HCl pH=8.0),滚动混匀。⑤30 $^{\circ}$ C 孵育30min,2000g 离心8min,将沉淀重悬于3mL RB (1.2M sorbitol,1% dextrose,100 μ g/mL Kanamycin),26 $^{\circ}$ C 培养12h。⑥加入20mL RB琼脂 (RB,1% agar,hygromycin B 8mg/L),轻柔混匀,10mL/平板铺板,26 $^{\circ}$ C 暗培养24小时。⑦取15mL含有10mg/L hygromycin B的PDA铺于RB平板,26 $^{\circ}$ C 培养至菌落突破上层PDA。

[0084] 3) 真菌表型鉴定。将转化菌株接种于PDA平板,24 $^{\circ}$ C 暗培养5天后观察菌落形态。与模拟转化的对照相比,转化不同RNA干扰片段的葡萄座腔菌均表现出不同程度的生长缺陷,其中引入dsALS-2 (SEQ ID No.6) 和dsALS-3 (SEQ ID No.7) 的转化菌株表型变化较为显著 (图5)。

[0085] 4) 目标基因表达水平分析。刮取转化菌株的菌丝,参照实施例1所述方法,提取总RNA并反转录为第一链cDNA。采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 方法,以葡萄球菌Actin基因为内参基因,检测ALS基因的表达水平。RT-qPCR使用QuantStudio 6系统,优化后的反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性30s;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 34s,40个循环。根据扩增曲线和溶解曲线来分析PCR反应的扩增效率和引物特异性。结果分析采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法。所使用引物如下:

[0086] ALS-q F CGATGTGGTGACGAATCAGGT

[0087] ALS-q R ACCTGTGATGCTGCATACGAA

[0088] Actin-q F GCGTGAAATCGTTCGTGACAT

[0089] Actin-q R ATGGAGTTGAAGGTGGTGACG

[0090] 与对照菌株相比,引入不同RNA干扰片段的葡萄座腔菌的ALS基因的表达水平均显著降低,其中dsALS-1和dsALS-2的表达量变化明显大于其他菌株(降幅分别达到80.5%和71.8%),表明SEQ ID No.5和SEQ ID No.6作为RNA干扰片段对ALS基因的干扰效果较好(图6)。

[0091] 实施例3在苹果中表达ALS基因RNA干扰片段提高其葡萄座腔菌抗性(应用实施例1)

[0092] 本发明采用TRV介导的VIGS技术,将优选的ALS基因RNA干扰片段dsALS-1和dsALS-2(核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6)引入苹果,以提高植物的葡萄座腔菌抗性(下述苹果的转化仅仅用来验证ALS基因的RNA干扰能够应用于植物抗病性改良,下述转化植株不是代代相传的生物材料)。

[0093] 1) 苹果的TRV渗透侵染。①TRV系统载体由清华大学刘玉乐老师提供。将核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6的ALS基因干扰片段dsALS-1和dsALS-2连接入pTRV2质粒的MCS区域(图7)。DNA测序进行验证后,将重组质粒和配套质粒pTRV1分别转化入农杆菌EHA105,用于苹果的渗透侵染。②苹果无菌苗用MS培养基(0.3mg/L IAA,0.2mg/L 6-BA,0.1mg/L GA3)在植物组织培养室(25℃,光周期16h/8h)内继代培养;转入1/2MS培养基(1.0mg/LIAA,0.4mg/L IBA)中诱导生根。生根苗在移栽前进行TRV真空渗透。将洗去培养基的植株浸入携带TRV载体的农杆菌重悬液,在40kPa的压力下抽真空90s,重复一次。用蒸馏水将菌液冲洗干净,将植株移栽于光照培养箱。③移栽四周后,采集第三叶位完全展开的新叶,利用半定量PCR(RT-PCR)技术检测TRV病毒在植株中的扩散情况,结果见图8。所用引物如下:

[0094] TRV1-rt F CCGAGGTAAGCAAGTCTG

[0095] TRV1-rt R GAATCGTCTCCACTGACAACC

[0096] TRV2-rt F GTTACTCAAGGAAGCACGAT

[0097] TRV2-rt R AACTTCAGACACGGATCTAC

[0098] EF1- α -rt F ATTCAAGTATGCCTGGGTGC

[0099] EF1- α -rt R CAGTCAGCCTGTGATGTTCC

[0100] 2) TRV苹果的抗病性评价。RT-PCR结果表明,病毒RNA在TRV渗透侵染的苹果植株中成功扩散。苹果植株TRV-dsALS-1和TRV-dsALS-2分别表达ALS基因干扰片段dsALS-1和dsALS-2,以渗透TRV空载的TRV-00植株为对照。葡萄座腔菌菌株LW347接种48小时后,参照实施例1所述方法,评价发病叶片的症状并测定病原菌的生物量;同时,提取接种部位的总RNA,参照实施例2所述方法分析病原菌ALS基因的表达水平。

[0101] TRV-dsALS-1和TRV-dsALS-2苹果的病斑面积相比TRV-00对照植株分别下降了43.9%和61.2%,表明其对葡萄座腔菌侵染的敏感性降低;其接种部位的真菌生物量也显著低于对照植株,分别为TRV-00的66.7%和36.8%。此外,苹果中表达的ALS基因RNA干扰片段能够抑制入侵葡萄座腔菌目标基因的表达,TRV-dsALS-1和TRV-dsALS-2真菌侵染部位ALS基因表达量为约对照植株的62.4%和40.6%(图9)。其中,TRV-dsALS-2苹果(RNA干扰片段的核苷酸序列为SEQ ID No.6所示)表现出更强的葡萄座腔菌抗性。RNA干扰片段dsALS-2(核苷酸序列为SEQ ID No.6所示)对葡萄座腔菌ALS基因有较好的干扰效果,在植物中表达这一片段能够有效提高植物抗病性。

[0102] 实施例4ALS基因RNA干扰片段用作抗菌活性物质防护葡萄座腔菌对苹果的侵染(应用实施例2)

[0103] 将优选的ALS基因RNA干扰片段dsALS-1和dsALS-2(核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6)制备为抗菌剂,能够防护苹果免受葡萄座腔菌的侵染。1)合成dsRNA。将RNA干扰片段dsALS-1和dsALS-2(核苷酸序列分别为SEQ ID No.5和SEQ ID No.6)合成为dsRNA的步骤同实施例2。

[0104] 2)真菌摄取试验。①将合成的dsRNA在不含RNase的超纯水中稀释至50ng/ μ L,涂布于PDA平板(1mL/板)。待完全吸收后,将葡萄座腔菌菌株LW347接种于其上,24 $^{\circ}$ C暗培养5天后,观察菌落形态。参照实施例2的方法利用RT-qPCR方法检测菌丝中ALS基因的表达水平。结果表明,葡萄座腔菌接种于dsALS-1和dsALS-2处理PDA平板,发生明显的生长缺陷,其ALS基因的表达水平显著低于接种于超纯水(RNase⁻)处理PDA平板的对照。环境中的dsRNA能够被葡萄座腔菌摄取,并在真菌体内诱发目标基因的沉默(图10)。

[0105] 3)将dsRNA用作抗菌活性物质。①将50ng/ μ L的含有ALS基因RNA干扰片段dsALS-1或dsALS-2的dsRNA溶液分别施加于苹果叶片表面(100 μ L/部位),用超纯水(RNase⁻)作为对照。②待风干后,参照实施例1所述,将葡萄座腔菌菌株LW347接种于施加部位,25 $^{\circ}$ C保湿培养48小时,拍照记录并评价叶片病斑发展情况,测定接种部位真菌生物量,并参照实施例2和实施例3所述方法检测真菌ALS基因的表达水平。结果表明,施加dsRNA溶液的接种点病斑面积明显小于对照接种点(dsALS-1和dsALS-2分别减小至69.4%和47.5%),病原菌生物量分别是对照部位的76.0%和53.8%。与接种于超纯水处理部位的真菌相比,接种于dsRNA处理部位的葡萄座腔菌的ALS基因表达水平显著降低(图11)。③进一步用超纯水(RNase⁻)将上述dsALS-2溶液稀释为25、10、5和1ng/ μ L,施加于苹果叶片后,接种葡萄座腔菌菌株LW347,参照上述方法分析不同浓度dsRNA溶液的防护效果。结果表明,RNA干扰片段dsALS-1或dsALS-2能够作为抗菌活性物质,其中10ng/ μ L的dsALS-2喷施于苹果叶片就能够有效抑制葡萄座腔菌的侵染,且较高浓度的dsRNA溶液可以对植物起到更好的保护作用(图12)。

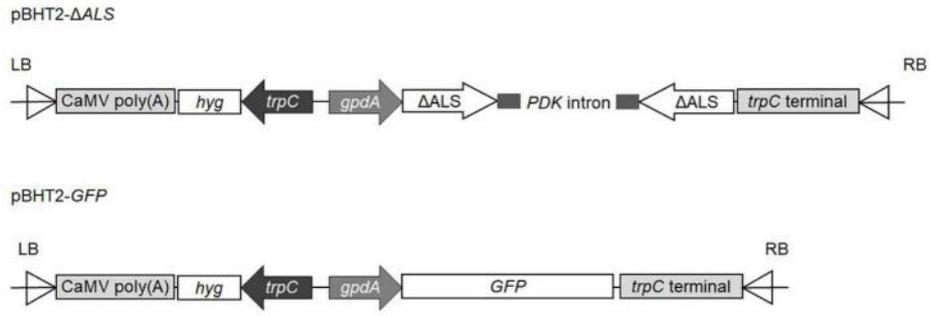
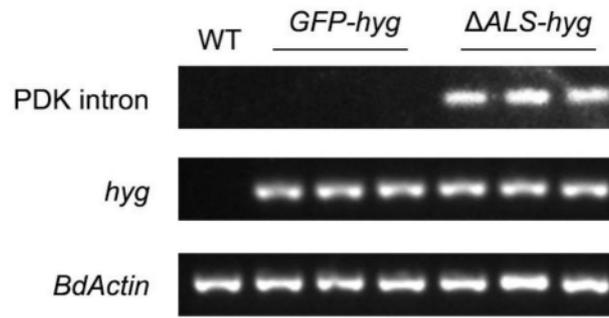
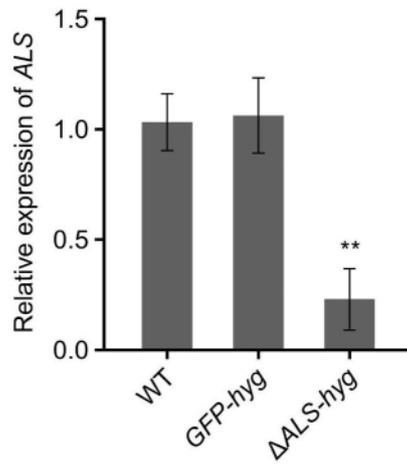


图1



A



B

图2

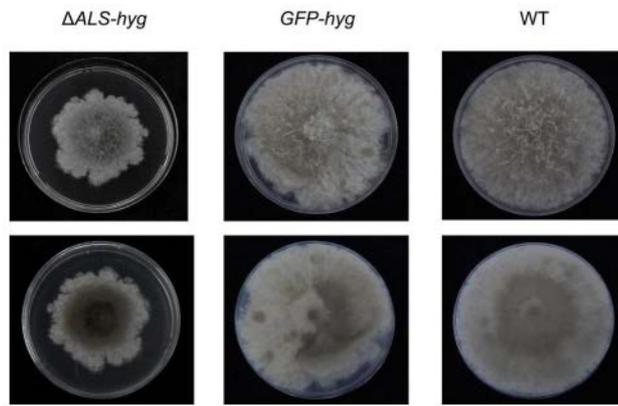
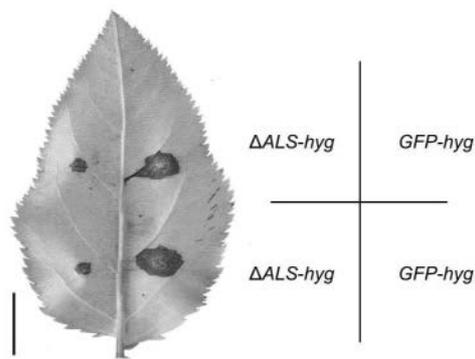
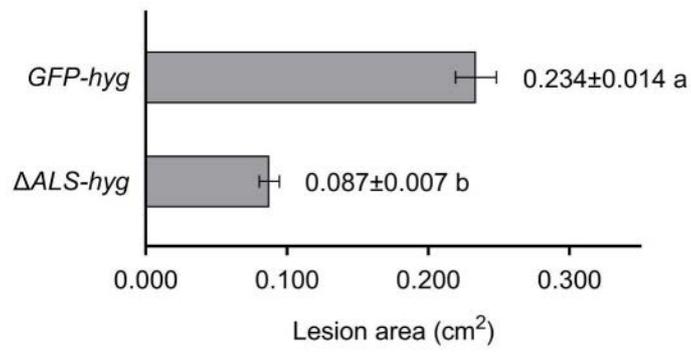


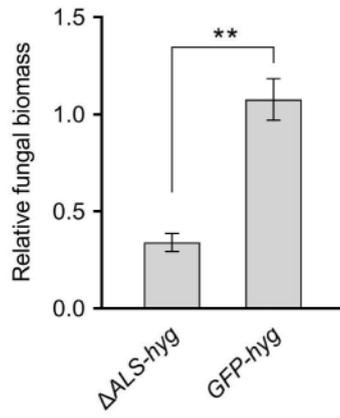
图3



A



B



C

图4

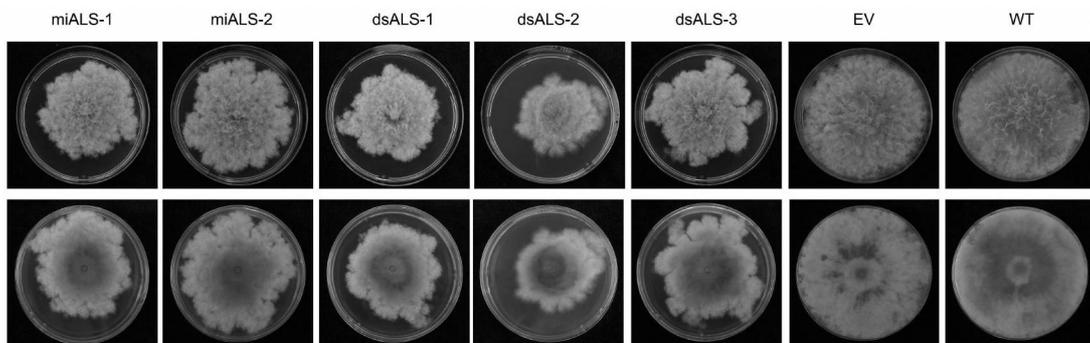


图5

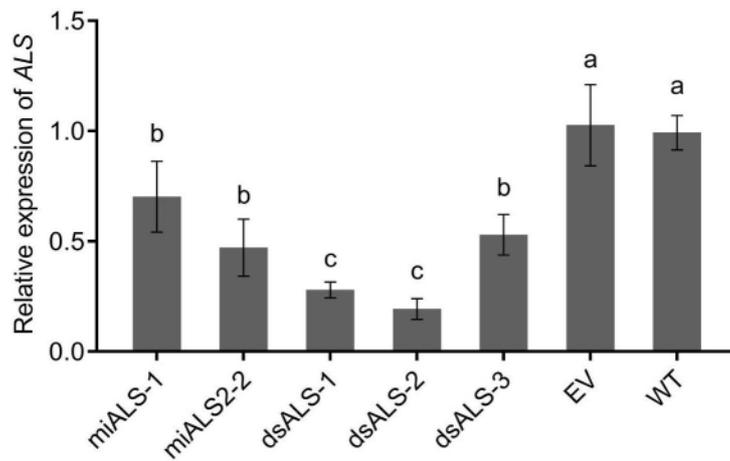


图6

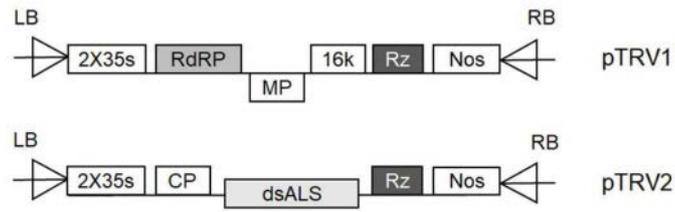


图7

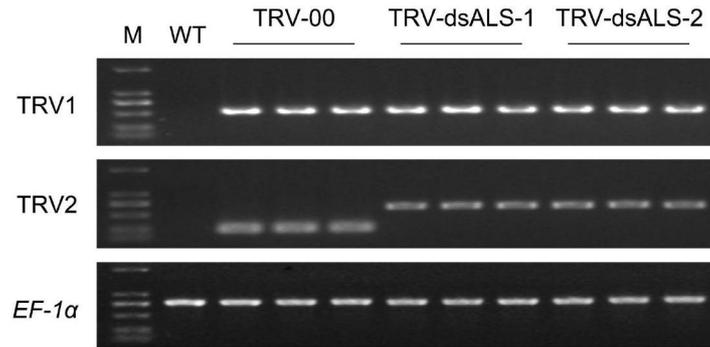
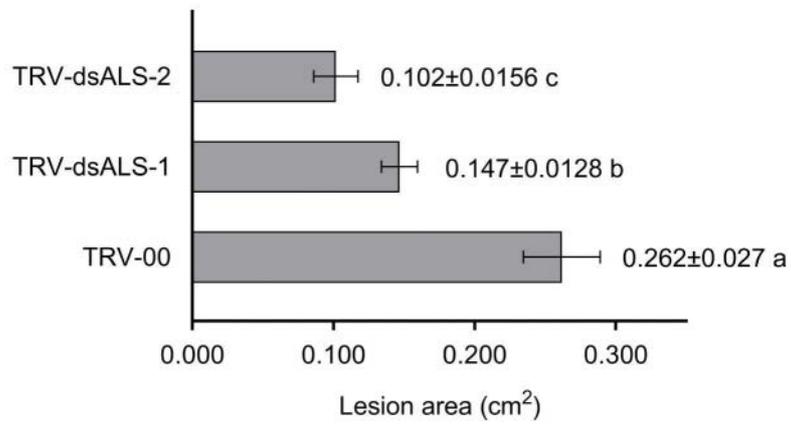
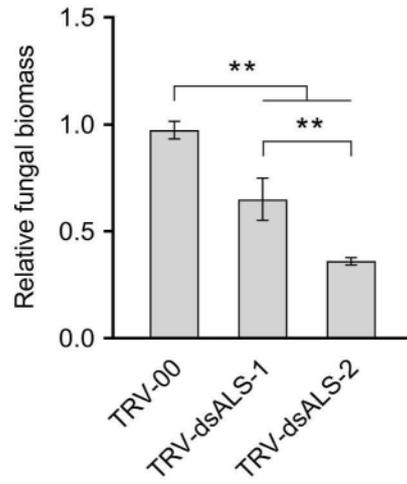


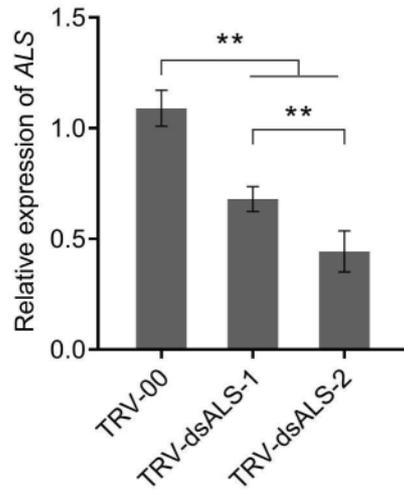
图8



A

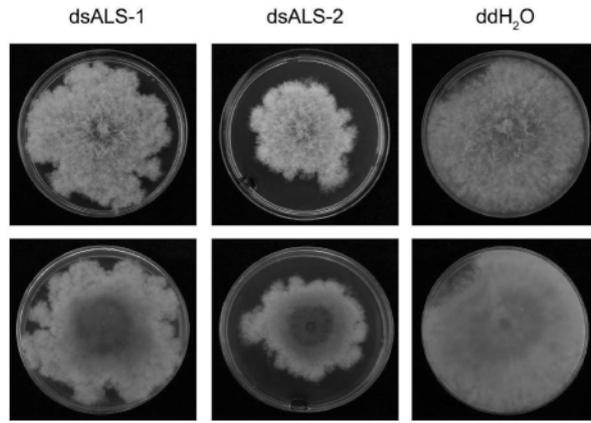


B

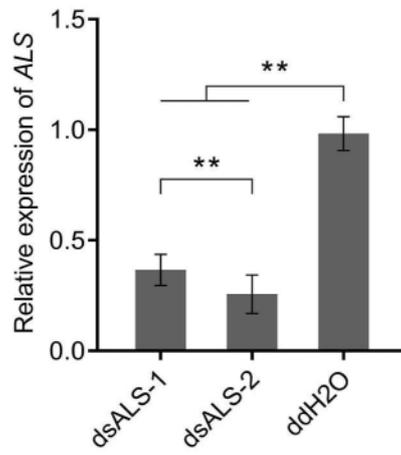


C

图9

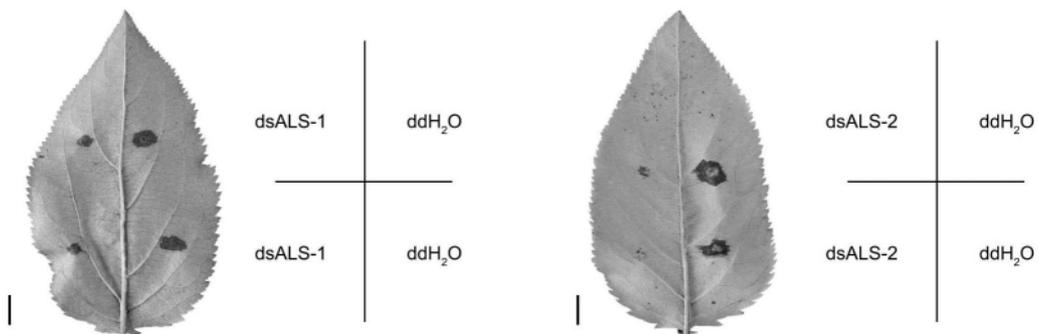


A

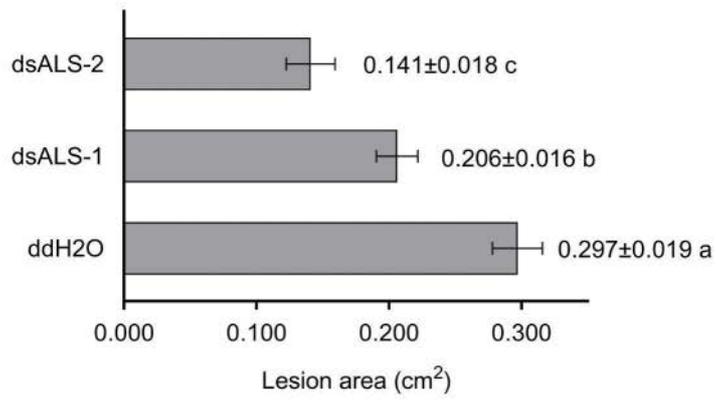


B

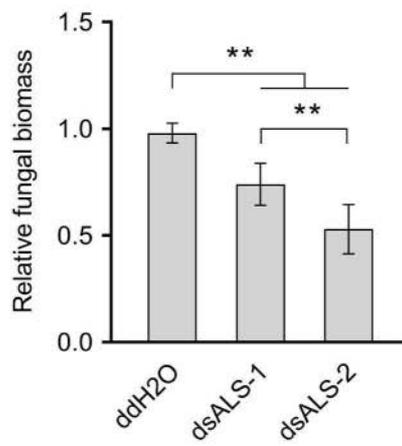
图10



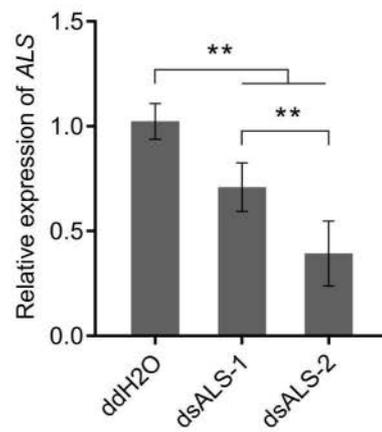
A



B

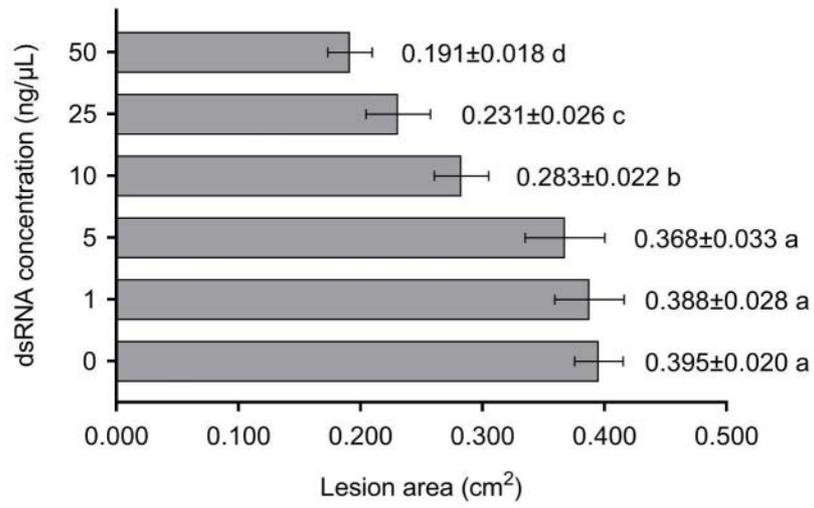


C

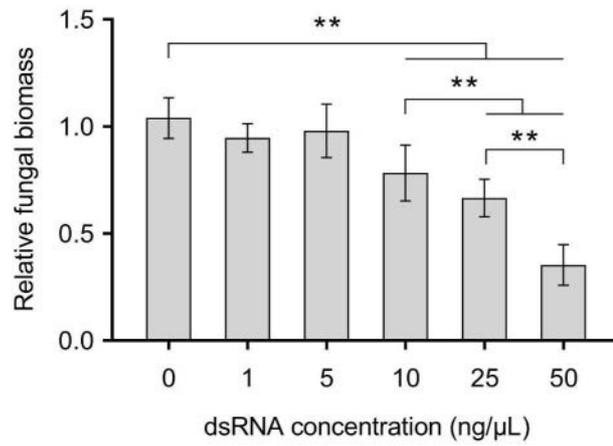


D

图11



A



B

图12