

Overexpression of TaSTT3b-2B improves resistance to sharp eyespot and increases grain weight in wheat

张增艳

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 星孢菌素和温度因子 3 (STT3) 是寡糖转移酶的催化亚基, 在天冬酰胺连接的糖基化中起重要作用。纹枯病, 是由坏死性营养的真菌病原体: 小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 引起的一种毁灭性的小麦疾病。然而, 小麦抵抗纹枯病菌的分子机制很大程度上仍然并不清楚。研究团队鉴定了两个小麦 STT3 的亚基基因: *TaSTT3a* 和 *TaSTT3b*, 并确定了它们在小麦中抵抗纹枯病菌及增加粒重的功能。*TaSTT3b-2B* 基因表达丰度与小麦对纹枯病菌抗性程度有关, 并可被纹枯病菌和外源茉莉酸 (JA) 同时诱导。转基因小麦品系经受纹枯病菌胁迫时, *TaSTT3b-2B* 的过表达显著增强了小麦纹枯病菌抗性、粒重和 JA 含量, 而沉默 *TaSTT3b-2B* 基因时会降低小麦对纹枯病菌的抗性。转录组分析表明 *TaSTT3b-2B* 影响一系列防御相关基因和茉莉酸生物合成相关基因以及编码淀粉合成酶和蔗糖合酶基因的表达。施用外源茉莉酸提高了上述防御和粒重相关基因的表达, 以及恢复了 *TaSTT2b* 沉默转基因品系小麦对纹枯病菌的抗性。而使用茉莉酸合成抑制剂 (二乙基二硫代氨基甲酸钠) 预处理, 可减弱 *TaSTT3b-2B* 介导的纹枯病菌抗性。这表明 *TaSTT3b-2B* 在纹枯病菌抗性调节及茉莉酸生物合成介导的粒重中起到重要作用。综上, 本研究揭示了 *TaSTT3b-2B* 在调节植物固有免疫和粒重方面的新功能, 以及阐明了它在分子育种中的潜在应用价值。

关键词: 粒重;茉莉酸;小麦纹枯病菌;STT3;转基因小麦;小麦

1 检测方法

ddPCR 测量转基因拷贝数: 研究团队开发了一种 ddPCR 分析 (使用 *PINb-D1b* 基因作为参照) 方法来估计转基因的拷贝数。设计引物和探针用于检测玉米 *Ubi* 启动子序列 (用于控制 *TaSTT3b-2B* 的表达)。

2 试剂和设备

2.1 试剂准备

每个测试组的 ddPCR 反应混合液包含 ddPCR 预混液 1x、每个引物对 1 μ M (用于参照

和转基因)、每个探针 250 nM 和 10 μ L 模板 DNA (~ 1 ng/ μ L), 以及用无 DNase 水将最终体积调至 15 μ L。

2.2 仪器设备

使用领航基因科技(杭州)有限公司生产的 DW3200。将反应混合液添加到微流控芯片中以产生液滴。然后进行 PCR 扩增, 需要在 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 接着进行 40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min)。PCR 扩增后, 芯片被加载到芯片扫描仪中进行荧光信号读取和进一步的数据分析。合成的 DNA 片段用作阳性对照, 无 DNase 的水用作阴性对照。

3 实验结果

研究团队鉴定到一个位于 2B 染色体上的寡糖基转移酶催化亚基编码基因 *TaSTT3b-2B*, 该基因受纹枯菌诱导表达, 其编码蛋白定位于内质网膜上。利用 VIGS 技术沉默该基因的表达水平显著降低了小麦对纹枯病的抗性, 而过表达该基因可以显著提高抗病性。在实验中, 领航基因微滴式数字 PCR 被用来精准定量研究转基因小麦品系中 *TaSTT3b-2B* 的拷贝数(六倍体小麦中 *PINb-D1b* 具有 2 个拷贝, 被用作参照)。ddPCR 结果显示转基因品系 OX49 和 OX74 各包含 2 个 *Ubi-TaSTT3b-2B-Tnos* 拷贝, OX89 包含 3 个拷贝(如下图)。进一步研究发现, 茉莉酸处理能够诱导 *TaSTT3b-2B* 基因的表达水平, 且 *TaSTT3b-2B* 基因的过表达促进了 JA 的合成。

