



通过 *GbF3'H* 基因单独沉默及其与 *GbCHI* 和 *GbDFR* 基因共沉默研究其在海岛棉中抗枯萎病功能

李玉霞, 曲延英, 艾海提·艾合买提, 王慧敏, 黄启秀, 陈琴, 陈全家*

(新疆农业大学农学院 / 新疆农业大学农业生物技术重点实验室, 乌鲁木齐 830052)

摘要:【目的】通过沉默海岛棉 *GbF3'H* 基因及共沉默 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 基因, 研究其在海岛棉抗枯萎病中的作用。【方法】以海岛棉抗病材料 06-146 为研究对象, *GhCLA1* 基因为阳性对照, 空载体为阴性对照, 构建海岛棉 TRV₂-*GbF3'H* 沉默载体, 协同课题组前期构建的 TRV₂-*CHI* 和 TRV₂-*DFR* 载体, 利用病毒诱导的基因沉默技术 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 分别进行 *GbF3'H* 基因单独沉默以及 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 这 3 种基因共沉默试验。通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (Quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析各处理样品中基因沉默情况; 设置室内接种枯萎病菌试验测定病情指数, 分析各沉默材料对枯萎病的抗性差异。【结果】qRT-PCR 结果显示, 海岛棉 *GbF3'H* 基因沉默后其在海岛棉根、茎和叶中的表达量比空载体对照低, *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 这 3 种基因共沉默后其在海岛棉根、茎和叶中的表达量均比空载体对照低。病情指数调查结果显示, 野生型 < 空载体对照 < *GbF3'H* 单基因沉默组 < 3 种基因共沉默组, 说明共沉默材料对枯萎病的抗性明显低于单基因沉默材料, 单基因沉默材料明显低于空载体对照和野生型。【结论】初步确定 *GbF3'H* 基因对提高海岛棉枯萎病抗性有一定作用, 且可与 *GbCHI*、*GbDFR* 基因协同作用增强抗病性, 这可为海岛棉功能基因组学研究提供参考。

关键词: 海岛棉; *GbF3'H*; 枯萎病抗性; 病毒诱导的基因沉默 (VIGS); 共沉默; 实时荧光定量聚合酶链式反应

Through Single Silencing *GbF3'H* Gene and Its Co-Silencing with *GbCHI* and *GbDFR* Genes to Study Their Function in Resistance to Fusarium Wilt in *Gossypium barbadense*

Li Yuxia, Qu Yanying, Aihaiti Aihemaiti, Wang Huimin, Huang Qixiu, Chen Qin, Chen Quanjia*

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University/ Laboratory of Agricultural Biotechnology of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to study the effect of silencing *GbF3'H* gene and co-silencing *GbF3'H*, *GbCHI* and *GbDFR* genes on resistance of *Gossypium barbadense* to Fusarium wilt. [Method] A disease resistant material 06-146 of *G. barbadense* was taken as the research objective, with *GhCLA1* gene as the positive control, and the empty vector (TRV::00) as the negative control. The *G. barbadense* TRV₂-*GbF3'H* silencing vector was constructed, and the TRV₂-*CHI* and TRV₂-*DFR* vectors were constructed in cooperation with the research group in the early stage. The *GbF3'H* gene was silenced separately and co-silenced with the *GbCHI* and *GbDFR* by using the virus-induced gene silencing technology. The gene silencing status in each treatment samples were analyzed by quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The differences of resistance of each treatment materials to Fusarium wilt were analyzed by investigating the disease index after *Fusarium oxysporium* inoculation. [Result] The results of qRT-PCR showed that the expression level of *GbF3'H* gene in the roots, stems and leaves of *G. barbadense* after its silencing was lower than that of the empty vector control, and the expression level of *GbF3'H*, *GbCHI* and *GbDFR* genes in the roots, stems and leaves of *G. barbadense* after co-silencing was lower than that of the empty vector control. The disease index investigation showed wild type < TRV::00 < *GbF3'H* single gene silencing group < three genes

收稿日期: 2019-08-10 第一作者简介: 李玉霞 (1993—), 女, 硕士, 751232545@qq.com。* 通信作者: chqjia@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31560409)

co-silencing group, which indicates the resistance of co-silencing materials to Fusarium wilt was significantly lower than that of single gene silencing materials, and the resistance of single gene silencing materials was significantly lower than those of the empty vector control and wild type. [Conclusion] The results showed that *GbF3'H* gene had a certain effect on the resistance of *G. barbadense* to Fusarium wilt, moreover, synergistic effect with *GbCHI* and *GbDFR* genes to enhance disease resistance. These results provide a reference for functional genomics of study *G. barbadense*.

Keywords: *Gossypium barbadense*; *GbF3'H*; Fusarium wilt resistance; virus-induced gene silencing (VIGS); co-silencing; quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

目前陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 和海岛棉 (*G. barbadense*) 是生产上主要的两大栽培种。海岛棉在纤维长度、断裂比强度和细度等方面比陆地棉更优异,而枯萎病也是海岛棉生产中危害最为严重、造成经济损失最大的病害之一^[1-2]。棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*) 是 1 种尖孢镰刀菌萎蔫专化型引起土壤维管束真菌病害^[3]。其主要防治措施有种植抗病品种、选购包衣棉种、适时播种与起垄种植、轮作换茬、清除病株与控制病情、增施有机肥和药剂防治^[4-6],但至今没有能够有效防治枯萎病的杀菌剂。研究表明,植物在抵御病原危害过程中会启动自身的防御体系,发展出基于病原的特异性免疫系统^[7]。因而研究海岛棉抗枯萎病分子机制,通过棉花功能基因组学分析来解析农艺性状调控的基因网络^[8-10],进而培育出抗病抗逆高产高效优质的棉花新种质,是防治枯萎病的 1 种最经济有效的方法^[11-12]。

在我国海岛棉的主要生产区新疆南疆,近年来枯萎病危害日益加重,对海岛棉产量和纤维品质造成了很大影响,因而近几年对于海岛棉抗枯萎病的研究逐渐增多,也取得了初步进展。本实验室前期转录组测序和抗病表达谱数据筛选出来的类黄酮代谢途径关键基因 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 与抗病性有关。研究表明,类黄酮 3'-羟化酶 (Flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 是细胞色素 P450 酶家族 (Cytochrome P450, CYP450) 的单加氧酶,在植物次生代谢和逆境调控方面起重要作用,它催化柚皮素和二氢山奈素的 B 环 3' 位置羟基化,从而与柚皮素和二氢山奈素氧化形成的一系列类黄酮途径中重要中间产物的结构稳定性和抗氧化功能密切相关^[13-14]。前人的研究证实 *GbCHI* 基因是花色素苷合成途径早期的关

键酶之一,其表达效率直接影响植物花和果实的色泽和质量^[15-16]。调控 *CHI* 基因的表达对于类黄酮合成有一定的影响^[17],诱导 *CHI* 基因表达能增加类黄酮的含量,相反抑制 *CHI* 基因的表达则会降低类黄酮含量,这在矮牵牛^[18]、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)^[19] 和甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)^[20] 等植物中均得到证明。二氢黄酮醇-4-还原酶 (DFR) 是植物花青素合成途径中的关键酶,它在不同植株间具有高度的同源性^[21]。有研究表明,DFR 功能的缺失会使植物的组织或器官的颜色变浅或者呈现无色。所以,应用植物基因工程来改变植物组织或器官的颜色大多围绕 DFR 开展工作^[22-25]。根据植物中的类黄酮代谢途径^[26],*GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 这 3 种基因之间的关系是:(1)*GbCHI* 基因为 *GbDFR* 和 *GbF3'H* 的上游调控基因;(2) 同时 *GbCHI* 基因通过调控 *GbF3'H* 基因进而调控 *GbDFR* 基因;(3)*GbF3'H* 基因也调控 *GbDFR* 基因。

由于 F3'H 催化生成的圣草酚 (Eriodictyol) 和二氢槲皮黄酮 (Dihydroquercetin) 是花青素和原花青素生物合成的重要中间产物,目前对 F3'H 基因的研究主要集中在花青素代谢支路,包括 F3'H 基因的表达量与植物不同器官颜色的相关性和 F3'H 基因对花色的修饰、对环境的应答、对逆境的抵抗等^[27-31],而对海岛棉 F3'H 基因抗枯萎病性的研究尚且很少。因此,本研究利用烟草脆裂病毒 (Tobacco rattle virus, TRV) 载体构建病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 体系,在海岛棉中有效沉默 *GbF3'H* 基因,并利用 TRV 载体可以在同一棉株上对多个靶基因序列进行同时沉默的特性^[32],在同一株海岛棉中同时沉默 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 基因,研究 *GbF3'H* 基因单独沉默,以及 *GbF3'H*、*GbCHI*

和 *GbDFR* 这 3 种基因共沉默对海岛棉抗枯萎病性的影响,为后续研究海岛棉基因的抗枯萎病功能、创制新的海岛棉抗枯萎病种质资源和进行海岛棉功能基因组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

海岛棉抗病材料 06-146,由新疆农业大学作物遗传育种实验室保存。病毒载体 (pTRV₁、pTRV₂) 及白化阳性对照载体 (pTRV₂-CLA1),由南京农业大学郭旺珍教授赠予。农杆菌菌株 (GV3101) 和枯萎病菌 (生理小种 7 号),由本实验室保存。DNA 琼脂糖回收试剂盒、质粒小提试剂盒、多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒是购自天根 (Tiangen) 生化科技有限公司。pEASY-T1 Cloning Kit、TransStart Tip Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司,逆转录试剂盒 (RevertAid First strand cDNA Synthesis kit)、*Xba* I 酶、*Kpn* I 酶、T₄ DNA 连接酶购于 ThermoFisher 公司,硫酸卡那霉素 (Kanamycin)、庆大霉素硫酸盐 (Gentamycin sulfate)、吗啉乙磺酸 (2- (N-morpholino) ethane sulfonic acid, MES)、MgCl₂、乙酰丁香酮 (Acetosyringone) 购自国内生物公司。

Luria-Bertani (LB) 培养基固体 / 液体:酵母提取物 5 g (英国 OXOID 公司),胰蛋白胨 10 g (英国 OXOID 公司),氯化钠 10 g,琼脂粉 (固体) 15 g,用蒸馏水定容至 1 L。

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基固体 / 液体:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 (固体) 20 g,用蒸馏水定容至 1 L。

1.2 VIGS 目的片段的获得及载体构建

以本实验室前期的转录组数据和荧光定量筛选为基础^[20],利用转录组测序拼接得到的 UniGene 序列,结合 NCBI 数据库中 Blast 搜索结果,获得类黄酮代谢途径关键基因的编码区,提取经枯萎病菌处理后的海岛棉 06-146 下胚轴的 RNA,逆转录成 cDNA 为模板,通过聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 克隆海岛棉类黄酮代谢途径关键基因 *GbF3'H* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列,进行琼脂糖

凝胶纯化回收,回收产物用于转化大肠杆菌,用测序正确的 *GbF3'H* 基因大肠杆菌菌液提取质粒,用于扩增构建 VIGS 载体所需的片段。从海岛棉 *GbF3'H* 基因的保守区域中选取带特异位点的 395 bp 核苷酸序列设计引物,并在引物的 5' 端分别加入限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 的酶切位点和保护碱基 (表 1),扩增海岛棉 *GbF3'H* 基因 ORF 上位于 27~421 bp 的片段,目标扩增片段长度为 395 bp,送北京六合华大基因科技有限公司测序正确后,提取质粒,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切,酶切产物进行琼脂糖电泳回收。同时,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切 VIGS 病毒载体 pTRV₂ 质粒,并进行胶回收。上述双酶切后的目的片段与载体使用 T₄ DNA 连接酶进行连接,连接产物转化至大肠杆菌中,通过菌液 PCR 筛选阳性克隆,提取质粒,经酶切验证获得重组质粒 pTRV₂-*GbF3'H*,将提取的质粒转入农杆菌,扩大培养农杆菌菌液用于后续试验。

1.3 棉花种植与培养

挑选饱满脱绒种子,75% (体积分数) 酒精消毒后,30% (体积分数) 过氧化氢浸泡 4~5 h,无菌水冲洗多次后浸泡 30 h,将露白的种子播种于土壤中 (黑土与蛭石体积比 1:1),置于人工气候室培养 (23 °C 恒温,16 h 光照 / 8 h 黑暗)。每隔 5~6 d 浇一次水,待棉苗 2 片子叶平展开而真叶尚未伸出时,即可用于 VIGS 操作。

1.4 农杆菌介导的 VIGS 方法

在 100 mL LB 液体培养基中加入 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素、50 mg·L⁻¹ 庆大霉素、10 mmol·L⁻¹ MES、20 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮,然后接入 1% (体积分数) 携带有目的片段的沉默载体菌液,28 °C、220 r·min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 1.2~1.5。离心收集菌体细胞悬浮于 VIGS 重悬液中 (10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·L⁻¹ MES, 200 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮),调节侵染液最终浓度至 OD₆₀₀ 为 1.5 左右,黑暗中静置 3~4 h。

设置以下处理:阴性对照 (TRV::00)、阳性对照 (白化表型)、*GbF3'H* 基因单独沉默处理 (记为“F3'H”) 和 3 种基因 (*GbF3'H*、*GbCHI*、*GbDFR*) 共沉默处理 (记为“共沉默”)。前 3 个处理方法是

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>GbF3'H</i>	F: GCTCTAGATCGGGATTTGGTAGCCGCAGCC R: GGGGTACCGCATGTGGAGTTACTCAGTTT	构建 <i>GbF3'H</i> 基因沉默载体所用引物(下划线为酶切位点) Primer for construction of <i>GbF3'H</i> gene silencing vector
<i>GbF3'H</i>	F: GTTATTTTCATCCGTCGTCTTC R: AGGTTCCCATTTTGAGGTAC	<i>GbF3'H</i> 实时荧光定量聚合酶链式反应所用引物 <i>GbF3'H</i> expression analysis by qRT-PCR
<i>GhUBQ7</i>	F: GACCTACACCAAGCCCAAGAAG R: TGAGCCCACACTTACCACAATAGT	内标对照 Reference gene as control
TRV ₂	F: GACATTGTTACTCAAGGAAGCAC R: AACCTAAAACTTCAGACACGGAT	空载体 Control vector
<i>GbCHI</i>	F: GGAAATCCAAGGGCAGTT R: TCTCAAAATCACCTGTAACGAC	<i>GbCHI</i> 实时荧光定量聚合酶链式反应所用引物 <i>GbCHI</i> expression analysis by qRT-PCR
<i>GbDFR</i>	F: GACAATGGCAGAGCAAGC R: GCAGTTATGAGGCTTGGC	<i>GbDFR</i> 实时荧光定量聚合酶链式反应所用引物 <i>GbDFR</i> expression analysis by qRT-PCR

注:下划线表示 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点。Note: Enzyme restriction sites for *Xba* I and *Kpn* I are underlined.

GbF3'H 的农杆菌重悬液以 1 : 1 比例混合后注射棉花子叶;3 种基因共沉默处理方法是 将 pTRV₁ 与 pTRV₂-*GbF3'H*、pTRV₂-*GbCHI*、pTRV₂-*GbDFR* 按 3 : 1 : 1 : 1 混合后注射棉花子叶。

接种操作:每个处理 50 株,3 个重复,采用注射器针头刺破法,造成微创伤口,刺破不刺穿子叶背面,用无针头的注射器从伤口打入侵染液,暗处理 1 d 后,置于上述人工气候室培养。

1.5 沉默效率的检测

棉株注射病毒 15 d 后,观察 pTRV₂-CLA1 幼苗真叶的颜色变化,并分别采取空载体对照组、单基因沉默组、共沉默组棉株的根、茎和叶,每组 3 株组成混池。混池分别提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。利用美国 ABI 公司 7500 Fast System 荧光定量 PCR 仪,以棉花 *GhUBQ7* 为内参基因,通过实时荧光定量 qRT-PCR 检测沉默后目的基因的表达,所用引物见表 1。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各基因的相对表达水平。

1.6 棉花枯萎病菌生理小种 7 号接种及抗性鉴定

枯萎病菌菌株接种于 PDA 固体培养基表面,23~25 ℃ 培养 2 周,转移至液体培养基以 60 r·min⁻¹ 振荡培养 7~9 d,4 层纱布过滤,调节至孢子含量 2×10⁷ mL⁻¹,现配现用。

在侵染野生型(Wild type, WT)、空载体对照组(TRV₂::00)、*GbF3'H* 单基因沉默组和 3 种基因共沉默组 15 d 后,进行枯萎病菌接菌处理,25 d 后观察并统计发病情况,每个处理 50 株,3 个重复,每株选取 3~4 片叶,每个处理共选取 500 片叶。采用 0~4 级方法统计病情指数^[33]。

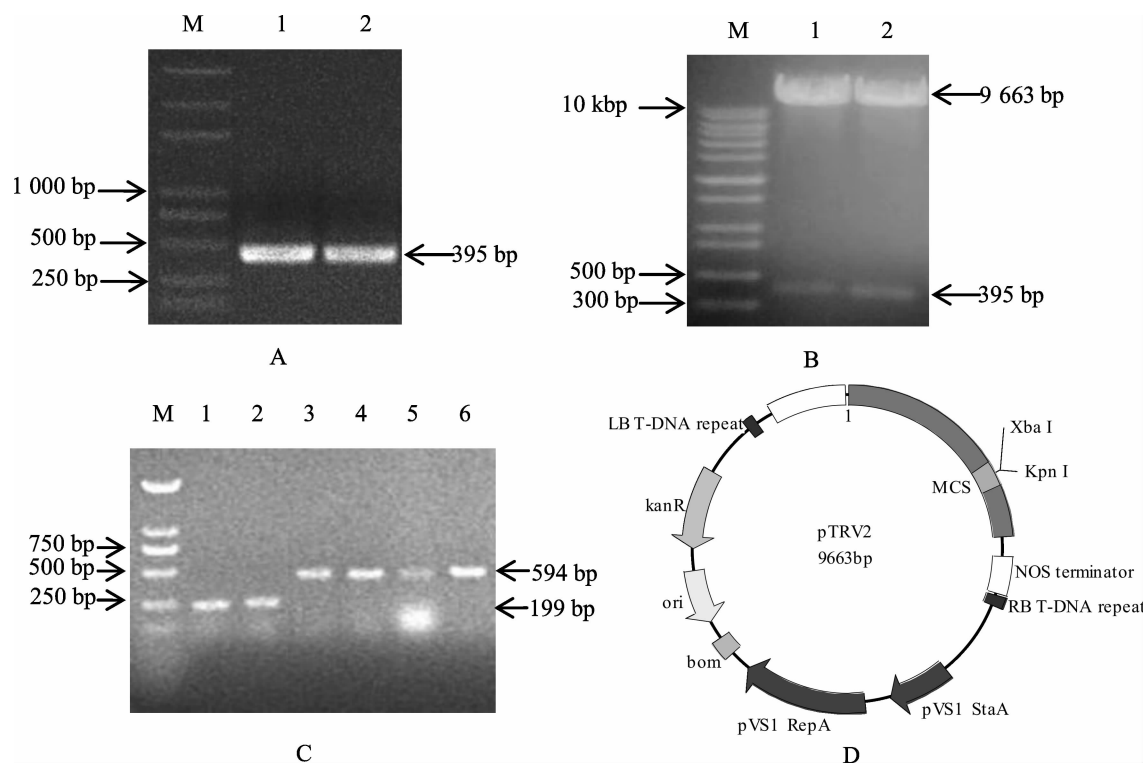
1.7 统计分析

用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 海岛棉 *GbF3'H* 基因用于 VIGS 目的片段的克隆及沉默载体构建

提取经枯萎病菌处理后的海岛棉 06-146 下胚轴的 RNA,逆转录成 cDNA 为模板,扩增获得构建 VIGS 载体所用的 *GbF3'H* 基因 395 bp 的目的片段(图 1 A)。沉默载体构建好后,提取质粒,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切进行验证。酶切片段大小与克隆片段一致,证明 pTRV₂-*GbF3'H* 载体构建成功(图 1 B)。将正确的 pTRV₂-*GbF3'H* 重组质粒转化入农杆菌 GV3101 中,用 TRV₂ 通用引物进行菌液 PCR 检测,以及用 TRV₂ 通用引物对空载体进行菌液 PCR 检测(图 1 C),正确的阳性克隆用于后续的侵染,测序证明重组载体 pTRV₂-*GbF3'H* 构建正确(图 1 D)。



A. PCR 扩增 395 bp 的 *GbF3'H* 片段。M: 5 kbp DNA marker, 1~2: 395 bp *GbF3'H* 片段。B. pTRV₂-*GbF3'H* 重组质粒双酶切验证。M: 10 kbp DNA marker, 1~2: pTRV₂-*GbF3'H* 重组质粒。C. 质粒和菌液 PCR 验证。M: 2 kbp DNA marker, 1: pTRV₂ 空载体质粒用 TRV₂ 通用引物扩增片段, 2: pTRV₂ 空载体 GV3101 菌液用 TRV₂ 通用引物扩增片段, 3~4: pTRV₂-*GbF3'H* 质粒阳性对照用 TRV₂ 通用引物扩增片段, 5~6: pTRV₂-*GbF3'H* GV3101 菌液用 TRV₂ 通用引物扩增片段。D. *GbF3'H* 基因沉默载体示意图。

A. Cloning of *GbF3'H* gene from *G. barbadense* 06-146. M: 5 kbp DNA marker, 1-2: 395 bp *GbF3'H* fragment. B. Plasmids of digested pTRV₂-*GbF3'H* by *Xba* I and *Kpn* I enzymes. M: 10 kbp DNA marker, 1-2: two individual plasmids of pTRV₂-*GbF3'H*. C. Plasmid and bacterial solution PCR verification. M: 2 kbp DNA marker, 1: pTRV₂ empty vector plasmid amplified fragment with TRV₂ universal primer, 2: pTRV₂ empty vector GV3101 bacterial liquid amplified fragment with TRV₂ universal primer, 3-4: pTRV₂-*GbF3'H* plasmid positive control amplified fragment with TRV₂ universal primer, 5-6: amplification fragment of pTRV₂-*GbF3'H* GV3101 bacterial liquid with TRV₂ universal primer. D. Schematic diagram of *GbF3'H* gene silencing vector.

图 1 *GbF3'H* 基因沉默序列的克隆及 VIGS 载体构建

Fig. 1 Cloning of *GbF3'H* gene silencing sequence and construction of VIGS vector

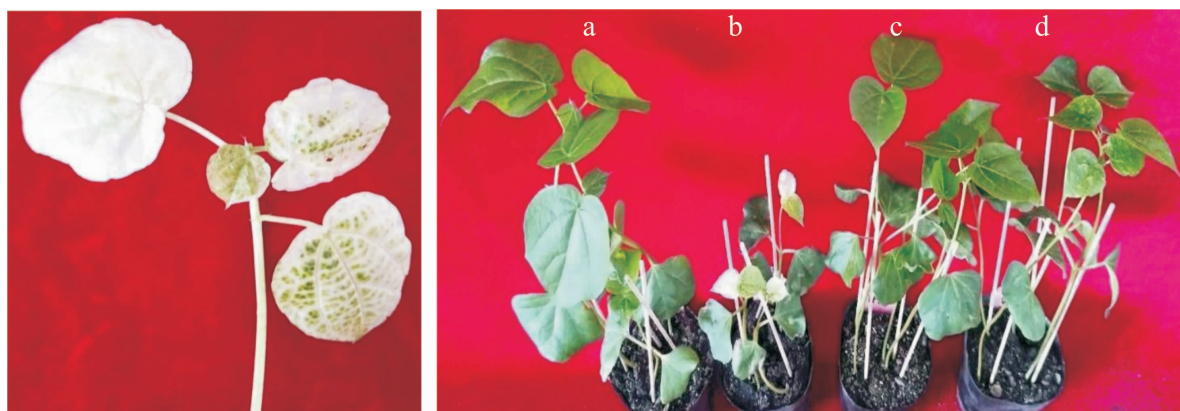
2.2 棉花 TRV-VIGS 体系的建立

注射 TRV::00 的棉花叶片未呈现白化, 表型与野生型无异。而注射 pTRV₂-CLA1 (阳性对照) 的植株, 棉花中叶绿素合成相关基因 *GhCLA1* 表达被沉默, 棉花的叶绿素合成受到干扰, 新出现的真叶表现为叶脉及边缘白化, 逐渐扩散到整个叶片, 从第 2 片真叶起, 表型明显, 嫩叶的白化比老叶更明显, 新生叶几乎完全白化 (图 2 A), 而且基因沉默后海岛棉植株的叶片变小, 株型紧凑, 子叶以上的茎变为白色。统计表明, 注射 pTRV₂-CLA1 的 96 株海岛棉全部白化。沉默

GbF3'H 基因的 150 株海岛棉, 及 *GbF3'H*、*GbDFR* 和 *GbCHI* 基因共沉默的 150 株海岛棉, 都比野生型海岛棉的株型紧凑, 叶片变小 (图 2 B)。表明本研究所用的 VIGS 技术体系对目的基因沉默效果显著。

2.3 目的基因的沉默效率

注射 TRV::F3'H 载体后, *GbF3'H* 基因在海岛棉根、茎和叶中都有沉默表现, 沉默效果是叶 > 根 > 茎, 其中在根和叶中与 TRV::00 处理比较, 差异达到极显著水平, 而在茎中与 TRV::00 处理比较没有显著性差异 (图 3)。TRV::F3'H、

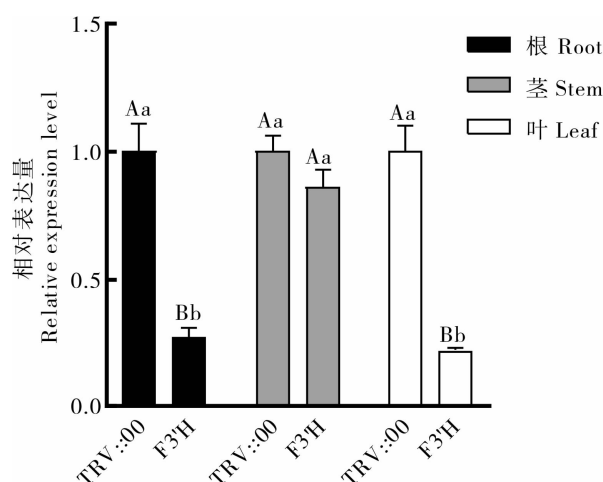


A. *GhCLA1* 基因沉默后海岛棉表型。B. 不同处理组的表型对比。a:野生型海岛棉植株,b:阳性对照的白化表型,c:单独沉默 *GbF3'H* 基因海岛棉植株,d:*GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 共沉默海岛棉植株。

A. Phenotype of *GhCLA1* gene silencing plants of *G. barbadense*. B. Phenotype comparison of different treatment plants. a: wild type of *G. barbadense* plants, b: albino phenotype of positive control plants; c: phenotype of *GbF3'H* gene silencing *G. barbadense* plants; d: phenotype of *GbF3'H*, *GbCHI* and *GbDFR* genes co-silencing *G. barbadense* plants.

图2 利用 VIGS 沉默目的基因后的海岛棉植株表型

Fig. 2 Phenotype of *G. barbadense* plants after silencing the target genes using VIGS



误差线表示标准差;不同大写、小写字母分别代表同一组织处理间比较达差异极显著水平(采用独立样本 t 检验, $P < 0.01$)、显著水平 ($P < 0.05$);字母相同者差异不显著。

Bar indicates standard error. Different capital letters, lowercase letters indicate extremely significant differences (Independent sample t test, $P < 0.01$) and significant differences ($P < 0.05$) between different groups in the same tissue; the same letters indicate no significant differences.

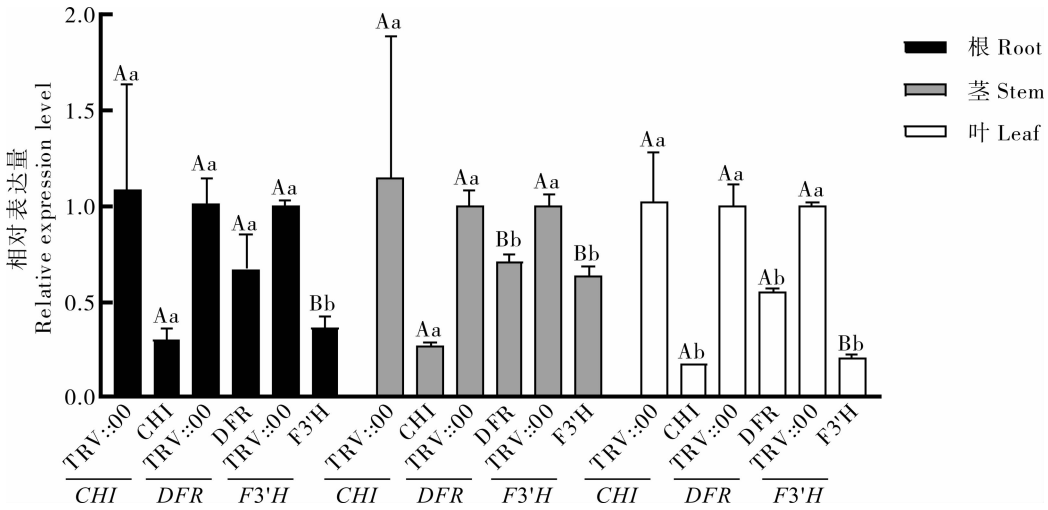
图3 *GbF3'H* 基因沉默后其在海岛棉根、茎和叶中的表达量

Fig.3 Expression of the *GbF3'H* gene in roots, stems and leaves of *G. barbadense* after VIGS

TRV::CHI 和 TRV::DFR 共侵染的海岛棉中 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 基因在根、茎和叶中的表达量均比 TRV::00 处理低。其中:*GbF3'H* 基因在海岛棉中的沉默效果是叶 > 根 > 茎,且在根、茎和叶中的表达量与 TRV::00 处理比较,均差异达到极显著水平;*GbCHI* 基因在海岛棉中的沉默效果是叶 > 茎 > 根,且在叶中的表达量与 TRV::00 处理比较,差异达到显著水平,在根和茎中与 TRV::00 处理比较,没有显著性差异;*GbD-DFR* 基因在海岛棉中的沉默效果是叶 > 根 > 茎,且在茎和叶中的表达量与 TRV::00 处理比较,分别达到差异极显著水平和显著水平,在根中与 TRV::00 处理没有显著性差异(图 4)。单独沉默处理和 3 种基因共沉默处理的 *GbF3'H* 基因在海岛棉根、茎和叶的表达趋势一致。

2.4 沉默基因棉株对枯萎病抗性鉴定结果分析

抗病性鉴定结果(图 5)显示,接种枯萎病菌后 25 d 时,不同处理病情指数大小分别为 WT (15.75) < TRV::00 (15.9) < F3'H (29.5) < 共沉默 (39.9),即注射基因沉默的棉苗发病比空载体对照棉苗严重,3 种基因共沉默处理比单独沉默 *GbF3'H* 基因处理病情更严重,病情指数更高。说明这 3 种基因对提高海岛棉总体抗性的作用要大于 *GbF3'H* 单个基因。

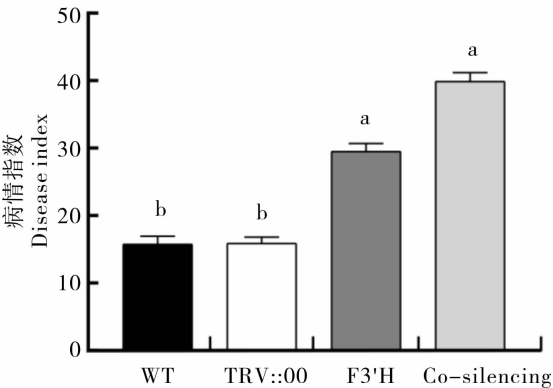


误差线表示标准差。不同大写、小写字母分别代表同一组织不同分组间比较 (TRV::00 与 CHI, TRV::00 与 DFR, TRV::00 与 F3'H) 达差异极显著水平 (采用独立样本 t 检验, $P<0.01$)、显著水平 ($P<0.05$); 字母相同者差异不显著。

Bar indicates standard error. Different capital letters, lowercase letters indicate extremely significant differences (Independent sample t test, $P<0.01$) and significant differences ($P<0.05$) between different groups (TRV::00 and CHI, TRV::00 and DFR, TRV::00 and F3'H, respectively) in the same tissue; the same letters indicate no significant difference.

图 4 共沉默后 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 基因在海岛棉根、茎和叶中的表达量

Fig. 4 Expression of the *GbF3'H*, *GbCHI* and *GbDFR* genes in roots, stems and leaves of *G. barbadense* after co-silencing



Co-silencing: *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 基因共沉默处理。误差线表示标准差。不同小写字母表示差异显著 (单因素方差分析, 最小显著差数法多重比较, $P<0.05$); 字母相同者差异不显著。

Co-silencing: *GbF3'H*, *GbCHI* and *GbDFR* co-silencing. Bar indicates standard error. Different letters indicate significant differences (One-way analysis of variance (ANOVA), least significant difference (LSD) method for multiple pair-wise comparisons, $P<0.05$); the same letters indicate no significant differences.

图 5 海岛棉基因沉默植株接种枯萎病菌后 25 d 时的病情指数分析

Fig. 5 Analysis of disease index at 25th day after inoculation with *Fusarium wilt* for the gene silencing *G. barbadense* plants

3 讨论

海岛棉中 *GbF3'H* 基因属于 P450 家族。P450 家族是超基因家族, 按功能主要分为参与生物合成和生物解毒两大类^[34]。*GbF3'H* 基因不仅是类黄酮代谢途径中的关键基因, 还在花色和果实的着色, 以及逆境调控方面起重要作用。关于类黄酮代谢途径相关基因与植物抗病性的关系前人也做过研究, 但主要集中在陆地棉中。目前关于海岛棉 *GbF3'H* 基因应对非生物胁迫的研究取得一定进展, 但是其作用机制研究还比较少。

本试验在前期转录组测序的基础上分析出类黄酮代谢途径与海岛棉抗病有关, 对类黄酮代谢途径相关基因进行克隆, 并利用病毒介导的基因沉默方法, 沉默所研究的基因。本研究和前人利用 VIGS 方法研究基因功能的不同点是: 本研究在同一株海岛棉中同时沉默 *GbF3'H*、*GbCHI* 和 *GbDFR* 这 3 种基因, 将基因沉默所需的时间、人力和物力最小化, 对功能基因组研究非常有利^[32]。对沉默基因棉株进行枯萎病菌接菌处理, 病情指数大小分别为 WT (15.75) < TRV::00 (15.9) < F3'H (29.5) < 共沉默 (39.9), 即基因沉默

的棉苗发病比空载体对照棉苗严重,3种基因共沉默处理比单独沉默 *GbF3'H* 基因处理病情更严重。说明这3种基因对提高海岛棉总体抗性的作用要大于单基因 *GbF3'H*。本研究进一步证实类黄酮代谢途径对海岛棉抵抗枯萎病起积极作用。但抗病基因在棉花中是如何调控棉花激活免疫反应提高抗病性还有待深入研究。

目前,海岛棉中存在大量尚未发现的抗病相关基因。VIGS 可用于瞬时下调基因表达,用于确定基因对特定表型的影响。这对于候选基因确定和选择具有控制病害潜力的基因尤其有用^[35]。随着 VIGS 病毒载体的不断开发,VIGS 体系已经应用于不同植物,尤其是用常规方法难以进行基因功能研究的,例如樱桃果实品质基因功能的研究^[36]。因此,利用 VIGS 方法,挖掘棉花中抗旱、耐盐、改良纤维品质、抗病相关等特异功能基因显得尤为重要。

4 结论

利用 VIGS 技术,初步确定 *GbF3'H* 基因与海岛棉对枯萎病的抗性有关,且可与 *GbCHI*、*GbDFR* 基因协同作用增强抗病性,可为今后海岛棉功能基因组学研究提供参考。

参考文献:

- [1] 黄启秀. 海岛棉类黄酮代谢途径中与枯萎病抗性相关基因的克隆及功能验证[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2017.
Huang Qixiu. Cloning and functional verification of genes related to Fusarium wilt resistance in flavonoid metabolism pathway of *Gossypium barbadense* [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2017.
- [2] 刘艳. 海岛棉枯萎病抗性相关基因的克隆及功能验证[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
Liu Yan. Fusarium wilt resistance related-gene cloning and functional analysis of *Gossypium barbadense*[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2013.
- [3] 陈捷胤, 戴小枫. 棉花对黄萎病的抗病机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 427-435.
Chen Jieyin, Dai Xiaofeng. Research progress of cotton resistance mechanism against Verticillium wilt[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(3): 427-435.
- [4] 孙淑敏. 棉花枯萎病与黄萎病的异同点及其防治措施[J]. 河北农业, 2014(10): 37-38.
Sun Shumin. Similarities and differences of cotton Fusarium wilt and Verticillium wilt and their control measures[J]. Hebei Agriculture, 2014(10): 37-38.
- [5] 李博, 肖芳秀. 百泰防治棉花枯萎病药效试验研究[J]. 现代农业科技, 2011(10): 150-152.
Li Bo, Xiao Fangxiu. Experimental study on the efficacy of Baitai in controlling cotton Fusarium wilt[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011(10): 150-152.
- [6] 刘淑红. 邯郸地区棉花枯萎病的发生及防治措施[J]. 农业科技通讯, 2019(9): 301-302.
Liu Shuhong. Occurrence and control measures of cotton Fusarium wilt in Handan area [J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2019(9): 301-302.
- [7] Chisholm S T, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response[J]. Cell, 2006, 124(4): 803-814.
- [8] 李继洋, 雷建峰, 代培红, 等. 基于棉花 U6 启动子的海岛棉 CRISPR/Cas9 基因组编辑体系的建立[J]. 作物学报, 2018, 44(2): 227-235.
Li Jiyang, Lei Jianfeng, Dai Peihong, et al. Establishment of the *Gossypium barbadense* CRISPR/Cas9 genome editing system based on the cotton U6 promoter[J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(2): 227-235.
- [9] 徐立华. 我国棉花高产、高效栽培技术研究现状与发展思路[J]. 中国棉花, 2001, 28(3): 5-8.
Xu Lihua. Research status and development of high yield and high efficiency cultivation techniques of cotton in China [J]. China Cotton, 2001, 28(3): 5-8.
- [10] 孙学振, 施培, 周治国. 我国棉花高产栽培技术理论研究与展望[J]. 中国棉花, 1999, 26(4): 2-7.
Sun Xuezheng, Shi Pei, Zhou Zhiguo. Current status and prospects of theoretical research on high yield cultivation techniques of cotton in China[J]. China Cotton, 1999, 26(4): 2-7.
- [11] Cai Y F, He X H, Mo J C, et al. Molecular research and genetic engineering of resistance to Verticillium wilt in cotton: A review[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(25): 7363-7372.
- [12] 李秀青, 李月, 刘超, 等. 棉花黄萎病相关基因 *GhAAT* 的克隆与功能鉴定[J]. 分子植物育种, 2019, (2019-04-12) [2019-08-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20190410.0920.002.html>
Li Xiuqing, Li Yue, Liu Chao, et al. Cloning and functional identification of the related gene *GhAAT* of cotton Verticillium wilt[J]. Molecular Plant Breeding, 2019 (2019-04-12) [2019-08-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20190410.0920.002.html>
- [13] 夏涛, 高丽萍. 类黄酮及茶儿茶素生物合成途径及其调控研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2899-2908.

- Xia Tao, Gao Liping. Progress in the biosynthesis pathway and regulation of flavonoids and tea catechins[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2899-2908.
- [14] 王文丽, 吴致君, 刘志薇, 等. 茶树类黄酮 3'-羟化酶基因的克隆与表达特性分析[J]. 茶叶科学, 2017, 37(1): 108-118.
- Wang Wenli, Wu Zhijun, Liu Zhiwei, et al. Cloning and expression characteristics of 3'-hydroxylase gene of tea flavonoids[J]. Tea Science, 2017, 37(1): 108-118.
- [15] 李莉, 孙欣, 马君兰, 等. 异黄酮合成代谢调控关键酶 CHS、CHI 的特性与研究前景[J]. 大豆科学, 2007, 25(5): 762-765.
- Li Li, Sun Xin, Ma Junlan, et al. Characteristics and research prospects of key enzymes for isoflavone anabolic regulation CHS and CHI[J]. Soybean Science, 2007, 25(5): 762-765.
- [16] 蔡雯婷, 孙娟, 董文华, 等. 草莓果实查尔酮异构酶基因克隆及表达分析[J]. 北京农学院学报, 2019, 34(4): 40-44.
- Cai Wenting, Sun Juan, Dong Wenhua, et al. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene in strawberry fruit[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2019, 34(4): 40-44.
- [17] 涂佳丽. 桂花查尔酮异构酶基因 *OfCHI* 的克隆与表达分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2017.
- Tu Jiali. Cloning and expression analysis of the chalcone isomerase *OfCHI* from *Osmanthus fragrans*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2017.
- [18] Muir S R, Collins G J, Robinson S, et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(5): 470-474.
- [19] Cheng H, Li L L, Cheng S Y, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(1): 49-62.
- [20] Zhang Haichao, Liu Jingmei, Lu Hongyu, et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of *chalcone isomerase* gene with the elicitation treatment[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(8): 1205-1213.
- [21] 陈发波, 高健, 姚启伦, 等. 不同肉质颜色萝卜 DFR 基因表达差异分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 182-185.
- Chen Fabo, Gao Jian, Yao Qilun, et al. Differential expression analysis of *DFR* gene in different succulent color radishes[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 182-185.
- [22] 李亚丽, 李欣, 肖婕, 等. 二氢黄酮醇-4-还原酶在花青素合成中的功能及调控研究进展[J]. 西北植物学报, 2018, 38(1): 187-196.
- Li Yali, Li Xin, Xiao Jie, et al. Advances in studies on the function and regulation of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin synthesis[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(1): 187-196.
- [23] Wendell D L, Vaziri A, Shergill G, et al. The gene encoding dihydroflavonol 4-reductase is a candidate for the anthocyaninless locus of rapid cycling *Brassica rapa* (fast plants type)[J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(8): e0161394 (2016-08-22) [2019-07-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161394>
- [24] Baumbach J, Pudake R N, Johnson C, et al. Transposon tagging of a male-sterility, female-sterility gene, *st8*, revealed that the meiotic *MER3* DNA helicase activity is essential for fertility in soybean[J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0150482 (2016-03-01) [2019-07-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150482>
- [25] Kim S, Park J Y, Yang T J. Characterization of three active transposable elements recently inserted in three independent *DFR-A* alleles and one high-copy DNA transposon isolated from the *pink* allele of the *ANS* gene in onion (*Allium cepa* L.) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(3): 1027-1037.
- [26] 侯杰, 佟玲, 崔国新, 等. 植物类黄酮 3'-羟化酶 (*F3'H*) 基因的研究进展[J]. 植物生理学报, 2011, 47(7): 641-647.
- Hou Jie, Tong Ling, Cui Guoxin, et al. Research progress on 3'-hydroxylase (*F3'H*) gene of plant flavonoids[J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47(7): 641-647.
- [27] 何海旺, 潘华清, 张饶丹, 等. 飞机草类黄酮 3'-羟化酶基因 (*CoF3'H*) 的克隆及其在烟草中的表达[J]. 作物学报, 2015, 41(3): 479-486.
- He Haiwang, Pan Huaqing, Zhang Naodan, et al. Cloning of flavonoids 3'-hydroxylase gene (*CoF3'H*) from aircraft grass and its expression in tobacco[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(3): 479-486.
- [28] Zhou Wei, Gong Yifu, Lu Xu, et al. Molecular cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxy lase gene from purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(1): 295-302.
- [29] 秦晓晓, 宋婷婷, 张杰, 等. 观赏海棠 *McF3'H* 的克隆及不同品种间表达差异分析[J]. 北京农学院学报, 2013, 28(2): 11-14.
- Qin Xiaoxiao, Song Tingting, Zhang Jie, et al. Cloning of ornamental sea bream *McF3'H* and analysis of expression differences among different cultivars[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2013, 28(2): 11-14.
- [30] 黄敏杰, 文志丰, 池毓斌, 等. 橄榄类黄酮 3'-羟化酶 *CaF3'H* 基因的克隆及其表达特性分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 839-847.
- Huang Minjie, Wen Zhifeng, Chi Yubin, et al. Cloning and expression characteristics of flavonoids 3'-hydroxylase *CaF3'H* gene of olive[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(3): 839-847.
- [31] 张景霞, 王芙蓉, 高阳, 等. VIGS 技术及其在棉花功能基因组研究中的应用进展[J]. 棉花学报, 2015, 27(5): 469-473.
- Zhang Jingxia, Wang Furong, Gao Yang, et al. Progress of

- VIGS technology and its application in cotton functional genomics research[J]. *Cotton Science*, 2015, 27(5): 469-473.
- [32] 黄启秀, 曲延英, 姚正培, 等. 海岛棉枯萎病抗性与类黄酮代谢途径基因表达量的相关性[J]. *作物学报*, 2017, 43(12): 1791-1801.
- Huang Qixiu, Qu Yanying, Yao Zhengpei, et al. Correlation between resistance of Fusarium wilt and gene expression of flavonoid metabolism pathway[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(12): 1791-1801.
- [33] 王钰静. GhROP6 在棉花抗黄萎病中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- Wang Yujing. Functional study of GhROP6 in cotton against Verticillium wilt[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [34] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素 P450 基因与功能研究进展[J]. *药物生物技术*, 2008, 15(2): 142-147.
- He Lihong, Zhao Shujuan, Hu Zhibi. Research progress on plant cytochrome P450 gene and function[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 15(2): 142-147.
- [35] 李建平, 郝晓燕, 李琴, 等. 棉花 VIGS 病毒载体的构建及其在抗病基因功能鉴定的应用[J]. *新疆农业科学*, 2018, 55(7): 1203-1208.
- Li Jianping, Hao Xiaoyan, Li Qin, et al. Construction of cotton VIGS virus vector and its application in identification of disease resistance genes[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(7): 1203-1208.
- [36] 齐希梁, 李明, 刘聪利, 等. TRV 介导欧洲甜樱桃果实 VIGS 体系的建立[J]. *果树学报*, 2018, 35(11): 1309-1315.
- Qi Xiliang, Li Ming, Liu Congli, et al. TRV-mediated establishment of VIGS system in European sweet cherry fruits[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(11): 1309-1315.
-