论文

中国知名大学及科研院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

VIGS 技术高通量筛选棉花抗黄萎病相关基因

郑娜^{①②†}, 郭安慧^{①②†}, 翟伟卜^②, 郭慧敏^{①②}, 张珊珊^②, 张文蔚^②, 简桂良^②,
韩榕^{①*}, 齐放军^{②*}

① 山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004;

② 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hanrong@dns.sxnu.edu.cn; fjqi@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-01-15; 接受日期: 2016-02-21; 网络版发表日期: 2016-05-25

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2012ZX08009001)、国家自然科学基金(批准号: 31371898)和公益性行业(农业)科研专项经费(批准号: 201503109)资助

摘要 黄萎病是严重影响棉花生产的一种土传性维管束真菌病害, 长期以来, 因缺乏行之有效的手段, 有关棉花对黄萎病菌抗性分子机制的研究难度很大, 进展缓慢. 病毒诱导基因沉默(VIGS)这一反向遗传学技术的建立和应用, 为研究和阐明棉花基因的功能提供了新的契机. 本研究挑选可能与棉花抗黄萎病相关的基因, 通过 VIGS 方法进一步明确和验证这些基因在棉花抗黄萎病菌中的作用. 共成功构建了 62 个基因的 VIGS 载体, 通过重复筛选实验, 最终筛选出一些与棉花抗黄萎病相关的基因, 其中乙烯信号途径正调控因子 *EIN2*, 植物病原应答诱导蛋白基因 *DIR*, 木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(*XTH*)被沉默后, 沉默棉花植株对黄萎病菌的抗性明显减弱, 表明这些基因可能通过不同的信号途径参与棉花对黄萎病菌的抗性.

关键词 棉花, 黄萎病, VIGS, 高通量筛选, 抗性相关基因

棉花黄萎病是由大丽轮枝菌引起的一种严重危害棉花生产的土传性维管束真菌病害, 该病可导致棉花叶片黄化、萎蔫、脱落, 维管束褐变, 甚至整株枯死, 严重影响棉花的产量和品质^[1]. 棉花黄萎病危害严重, 难以防控, 很大程度上归咎于抗黄萎病抗源的缺乏^[2-4]. 有关棉花抗黄萎病分子机理的研究极为薄弱, 目前越来越多的研究开始运用基因芯片、深度测序、差减杂交、蛋白组学等方法, 以期从转录组, 基因组及蛋白质组学等不同层面探索棉花对黄萎病的

抗性差异, 了解和阐明棉花对黄萎病菌抗性的分子基础. 这些基础研究有助于揭示棉花对黄萎病的抗性机制, 为利用棉花对黄萎病的抗性机制奠定基础. Xu 等人^[5]利用 RNA 测序的方法对接种黄萎病菌的海岛棉(*Gossypium barbadense* L.) (抗病品种) 和陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.) (感病品种) 进行转录组分析, 结果显示苯丙烷代谢途径可能参与棉花对黄萎病菌的抗性反应, 其中的代谢产物木质素在棉花抗病过程中起重要的作用; 此外还发现, *LRR-RLKs*, 一些植

引用格式: 郑娜, 郭安慧, 翟伟卜, 等. VIGS 技术高通量筛选棉花抗黄萎病相关基因. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 646–656
Zheng N, Guo A H, Zhai W B, et al. High throughput screening of *Verticillium dahliae* resistance genes by VIGS technology in cotton. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 646–656, doi: 10.1360/N052016-00035

物激素信号相关基因及转录因子也参与棉花对黄萎病菌的防卫反应. Sun 等人^[6]也运用 RNA 测序技术对接种黄萎病菌的海岛棉(抗病品种)和陆地棉中的抗病品种进行比较分析,发现苯丙烷代谢途径参与棉花对黄萎病菌的防卫反应,结果显示,接种黄萎病菌后,陆地棉中莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase, HCT)及海岛棉中的咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(caffeoyl-CoA O-methyltransferase, CCoAOMT)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate: coenzyme A Ligase, 4CL)、肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)、咖啡酸-O-甲基转移酶(caffeic acid-3-O-methyltransferase, COMT)均上调. Gao 等人^[7]利用蛋白质组学和病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)相结合的技术,发现在棉花抗黄萎病过程中棉子酚、油菜素内酯及茉莉酸途径起着重要作用. Xu 等人^[8]根据模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的相关信息,再结合 VIGS 技术高通量筛选,成功筛选出一些与棉花抗黄萎病相关的基因.此外,超表达 *GhDIR1*(dirigent-like protein)基因增加了木质素的含量,同时提高棉花对黄萎病菌的抗性,这可能是因为 *GhDIR1* 参与棉花的木质化,从而阻止了黄萎病菌的扩散^[9]. Yang 等人^[10]发现,接种大丽轮枝菌后,棉花抗病品种中的药物敏感基因 *GhDHS1*(drug-hypersensitive 1)显著上调,在拟南芥中超表达 *GhDHS1* 后,转基因植株对大丽轮枝菌的抗性显著增强,这表明 *GhDHS1* 参与棉花对黄萎病的抗病.棉花中表达杆状病毒细胞凋亡抑制基因 *p35* 和 *op-iap*,可增强棉花对黄萎病的抗性^[11]. Gao 等人^[7]通过 VIGS 的方法发现,同源拮抗基因 *GhBAK1*(Bcl-2 homologous antagonist/killer 1)介导棉花对黄萎病的抗性及细胞死亡.通过 VIGS 沉默 *WRKY* 类转录因子基因 *GbWRKY1* 的转录,可增强棉花对黄萎病菌的抗性^[12]. Yang 等人^[13]通过 VIGS 的方法沉默主要乳胶蛋白基因 *GhMLP28*(major latex protein 28)后,棉花对黄萎病菌更为敏感, *GhMLP28* 在此过程中为乙烯应答因子 *GhERF6*(ethylene responsive factor 6)的正调控因子,这两个蛋白可能在棉花中协同作用,共同抵制黄萎病菌的入侵. Fradin 等人^[14]发现,转化并表达 *Ve1* 基因的拟南芥对黄萎病菌抗性强,茉莉酸信号途径在这一抗性反应

中起着重要作用.大丽轮枝菌侵染棉花时, *GbWRKY1* 通过活化 *JAZ1* 的表达介导植物防卫向发育的转变,在此过程中 JA 和 GA 表现为拮抗互作^[12]. Zhang 等人^[15]对海岛棉根部转录组进行分析,发现苯丙烷代谢途径通过增强细胞壁从而阻止病原菌的入侵及扩散,而 SA 并不参与此过程.许多研究结果显示,乙烯诱导的 ERF 类转录因子,乙烯信号转导的相关基因及乙烯的合成在棉花与黄萎病菌的互作过程中起重要作用^[16-21].棉花的类萜途径已被证实为植物响应病原菌的一个重要因素^[22-24].这些结果显示了多种防卫途径参与了棉花对黄萎病菌的抗性作用,但具体的分子机制尚有待进一步研究.

VIGS 是利用反向遗传学策略揭示植物基因功能的重要技术之一,属于转录后基因沉默,其原理是根据同源防卫机制,通过构建含目的基因同源片段的病毒载体,与植物中的目的基因发生同源抑制,使目的基因沉默,导致植株表型发生改变的过程^[25].由于 VIGS 技术操作快速、简单,很小的片段便可达到沉默效果,可在短期内观察到基因沉默后表型的变化,特别适用于像棉花这样遗传转化操作难度大的植物,因此被广泛地应用于研究植物基因功能的研究^[26-28].利用棉花叶皱缩病毒(cotton leaf crumple virus, CLCrV)及烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)的 VIGS 体系已在棉花中成功建立^[29-31].目前利用 VIGS 技术研究已成功发现了一些棉花抗黄萎病的相关基因,如转录因子 *WRKY*、苯丙烷代谢相关基因、棉子酚、油菜素内酯相关基因等^[7,8,12,32].本研究基于实验室前期的基因芯片和抑制差减杂交的结果,利用 VIGS 技术高通量筛选棉花抗黄萎病相关基因,为进一步揭示棉花对黄萎病菌抗性的分子机理,提高棉花对黄萎病的抗性开展基础性的工作.

1 材料与方法

1.1 材料培养

棉花材料为本研究室选育的陆地棉抗黄萎病品系 KV3.选取外观一致的饱满种粒,先用 75%的乙醇消毒 5 min,再用 3%的双氧水处理 2 h,然后用无菌水冲洗 3~5 遍,播种于蛭石和营养土(1:1)中,每盆播种 5~6 颗种子.将花盆放置在 28/22 °C (day/night), 16/8 h(light/dark)条件下培养,适时浇水,保持 70%~80%的含水量.

将保存于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中的大丽轮枝菌强致病力落叶型菌株 V991(*Verticillium dahliae* Kleb.)活化, 进行单孢分离. 挑取单孢培养的菌体在 Czapek's 培养液^[33]中, 25℃, 200 r/min, 培养 3~5 天. 待棉苗第二片真叶完全展开时, 采用蘸根法接种大丽轮枝菌 V991, 孢子浓度调至 1.0×10^7 个孢子/mL^[34].

1.2 棉花 RNA 的提取

参照葛晓萍和石琰璟^[35]的方法, 具体操作如下. 液氮研磨棉花组织至粉末, 随液氮转移至 50 mL 离心管中, 待液氮挥发完后迅速加入适量已预热的十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)提取缓冲液(2% CTAB, 2% 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP), 100 mmol/L Tri-HCl(PH8.0), 25 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(PH8.0), 2 mol/L NaCl, 2% β -巯基乙醇(用前加)), 剧烈混匀, 65℃温浴 8 min, 之后加入等体积的氯仿, 颠倒混匀; 4℃, 9300×g, 离心 15 min, 将上清液转移至新的无 RNAase 离心管中, 加入等体积的氯仿反复抽提数次; 向上清液中加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 置于 4℃冰箱过夜; 4℃, 13400×g, 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 500 μ L 75% 乙醇洗涤两次; 置于超净工作台(苏净, 中国)中自然干燥, 用 30 μ L 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水回溶 RNA; 溶解后的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以确定 RNA 是否完整; 用核酸蛋白检测仪 Nanodrop 2000(Thermo, 美国)对得到的 RNA 进行浓度及质量测定, 最后置于-80℃超低温冰箱贮存备用.

1.3 VIGS 载体的构建

本试验利用棉花皱缩病毒(cotton leaf crumple virus, CLCrV)沉默载体 pCLCrVA 和 pCLCrVB 构建 VIGS 载体, 由浙江大学周雪平教授馈赠. 将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因片段(网络版附表 1), 回收后, 连接 pMD-18T simple vector, 构建成中间表达载体 pMD-GhX. 将中间载体 pMD-GhX 和 VIGS 沉默载体 pCLCrVA 分别用 *Spe* I/*Pac* I 双酶切, 以回收的目的片段和载体摩尔比为 1:1 的比例进行连接, 构建成 VIGS 沉默载体 pCLCrVA-GhX. 冻融法将构建的 VIGS 沉默载体

pCLCrVA-GhX, pCLCrVA 和 pCLCrVB 分别转入根癌农杆菌菌株 EHA105 中.

1.4 棉花的 VIGS

棉苗子叶平展时进行. 取含有 VIGS 沉默载体的 EHA105 菌株, 28℃培养至对数生长期, 6000×g 离心 5 min, 收集菌体, 再用乙酰丁香酮溶液(10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES), 200 μ mol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, As), 10 mmol/L $MgCl_2$)重悬菌体, 并调整菌液浓度至 $A_{600}=1.0$ 左右. 将它们分别与含 pCLCrVB 的菌株 1:1 混合, 室温静置放置 3 h 后用于植物接种. 同时混合含 pCLCrVA 和 pCLCrVB 的 EHA105 菌株, 作为空载体对照, 用于植物接种. 待棉苗子叶完全展开时, 取一支 1 mL 的一次性注射器, 吸取菌液, 在子叶背部注射接种. 接种后将植株置于 25℃/20℃(16 h/8 h(光照/黑暗))培养, 15 天后基因沉默植株再接种大丽轮枝菌 V991, 检测各基因沉默后棉花植株对黄萎病菌抗性的变化.

1.5 病情指数

黄萎病菌接菌 3 周后, 调查植株真叶的发病情况, 并计算病情指数(disease index, DI). 病级分级标准: 0 级: 健株, 无任何病症; 1 级: 植株 25% 及以下真叶变黄或坏死; 2 级: 植株 25%~50% 真叶变黄或坏死; 3 级: 植株 50%~75% 真叶变黄或坏死; 4 级: 植株 75% 以上真叶变黄或坏死, 甚至光杆或死亡. 为了排除重复试验过程中因条件不同所带来的干扰, 提高实验结果的准确性和可靠性, 计算鉴定材料的相对病情指数.

病情指数 = $[\sum(\text{各级病株数} \times \text{相应病级}) / \text{调查总株数} \times \text{最高病级}(4)] \times 100$

鉴定材料相对病情指数 = (抗病对照品种的实际病指/10) × 鉴定材料实际病指, 其中 10 为规定抗病对照的标准病指.

1.6 qPCR

荧光定量 PCR 所用仪器为 Applied Biosystems 7500(Applied Biosystems, 美国), 所用试剂为 SYBR Premix Ex TaqTM kit(TaKaRa, 大连)的 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒. 以反转录 cDNA 为模板, 起始量均为 100 ng, 每个处理 3 次重复. 棉花看家基因 *Gbpol*-

yubiquitin-1^[36]为内标基因(GenBank AY375335.1)(网络版附表 2). 反应程序为: 退火(95℃, 30 s); 扩增(40 个循环; 95℃, 5 s; 60℃, 34 s); 溶解(95℃, 15 s; 60℃, 1 min; 95℃, 15 s).

1.7 组织特异性检测

采集棉苗的根、子叶、下胚轴部位、幼叶、茎, 液氮处理后放置-80℃备用. 提取各组织中的总 RNA, qRT-PCR 检测目的基因在各个组织中的转录水平, 棉花看家基因 *Gbpolyubiquitin-1*^[36]作为内标对照.

2 结果与讨论

2.1 叶绿素合成基因 *CHLI* 和 *CLA1* 验证 VIGS 实验体系

2008 年, 首次报道利用 CLCrV 作为 VIGS 载体, 并通过粒子轰击的方法沉默棉花基因^[29]. 周雪平课题组^[30]利用改进的 CLCrV 的 VIGS 载体结合农杆菌介导入侵的方法有效并持久地沉默棉花基因, 本研究即利用了这一载体系统. 为了验证 VIGS 体系是否会沉默棉花内源基因的表达, 选取两个与叶绿素合成有关的基因作为阳性对照基因, 即: *CHLI* (magnesium chelatase subunit I gene)和 *CLA1* (chloroplastos alterados 1), 构建 VIGS 沉默载体 pCLCrV-*CHLI* 及 pCLCrV-*CLA1*. 棉苗子叶完全展开后, 利用携带有 pCLCrV-*CHLI*, pCLCrV-*CLA1* 及 pCLCrVB 的根癌农杆菌侵染植株, 结果沉默植株 10 天左右表型开始发生变化. 图 1 显示接种沉默载体 25 天后植株的表型, 沉默 *CHLI* 的植株表现出明显的表型变化, 多数叶片从叶脉向叶肉扩展成亮黄色(图

1B); 沉默 *CLA1* 的植株表型也发生明显改变, 多数叶片发生漂白现象(图 1C); 对照空载体植株则无表型变化(图 1A), 说明 CLCrV 载体对植株表型无影响. 对沉默植株植物进行统计发现沉默效率高达 90%~100%, 随后观察发现沉默表型与沉默时间呈正相关关系, 且沉默表型在棉花整个生长期持续有效.

2.2 VIGS 技术高通量筛选棉花抗黄萎病相关基因

根据实验室前期基因芯片和抑制差减杂交的结果, 筛选了转录因子类(transcription factors)、植物激素类(phytohormone)、先天免疫(innate immune)、病原菌相关(pathogen-related gene)、苯丙烷代谢(phenylpropane metabolism)、几丁质相关(chitin-related genes)、木葡聚糖(xyloglucan)、细胞壁大分子代谢(cell wall metabolism of macromolecule)、酸性磷酸酶(acid phosphatase)、黄叶基因(yellow-leaf-specific gene)等可能与棉花抗黄萎病相关的基因, 共计 106 个基因(网络版附表 1). 对这些基因进行 VIGS 沉默载体的构建, 成功构建 62 个目的基因的 VIGS 载体, 利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)及棉花数据库(<http://www.cottondb.org/>)对这些基因进行 blast 及保守域分析, 初步确定基因的基本信息, 将这些基因分组归类, 结果显示, 除了 *Gh46* 基因未搜索到相关信息外, 将其他基因分为 6 大类, 分别为转录因子(transcription factors)、植物激素(plant hormones)、苯丙烷代谢(phenylpropanoid metabolic)、酶类(enzymes)、细胞壁修饰(cell wall modification)和先天免疫(innate immunity).

利用 VIGS 技术, 对构建成功的载体进行抗病性筛选. 将野生型对照植株、空载体转化对照植株和基

图 1 *CHLI* 和 *CLA1* 基因沉默后棉花植株的表型

A: 空载体 CLCrV(A+B)转化对照; B: *CHLI* 基因沉默; C: *CLA1* 基因沉默

因沉默植株分为3组,各30株左右,进行大丽轮枝菌 V991 接菌,接菌后3周调查植株的发病情况.为了确保实验的准确性,筛选出稳定的参与抗棉花黄萎病的抗性相关基因,重复进行了3轮筛选试验,综合3次的病情指数,并对这些数据进行统计学分析.结果显示(图2A),相比野生型中植棉 KV3 接种 V991(CK+V991)后的病指,转化空载体 CLCrV 植株的病指略微下降,但两者之间无显著差异;有6个基因被沉默后

接种大丽轮枝菌 V991,其病指显著上升, $P<0.05$;其中3个基因为转录因子,分别是 *Gh39(bZIP)*, *Gh24(GRAS)*, *Gh58(WRKY)*,此外,还有乙烯信号途径的正调控因子 *Gh55(EIN2)*,参与细胞壁重构的木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, XTH)基因 *Gh114*,抗病相关基因 *Gh97(dirigent-like protein)*.还有两个基因被沉默后,其病指显著下降, $P<0.05$;这两个基因为 *Gh15*

(*bZIP*), *Gh31(NAC5)*. 随机抽取 8 个基因进行目的基因沉默效率的检测(图 2B), 相对接种空载体的中植棉 KV3 中目的基因的转录水平, 沉默目的基因植株中目的基因的转录水平都明显降低, 目的基因转录水平下降最多的可达到 92.33%; 下降最少的也达到了 43.85%, 这表明利用 CLCrV 载体可以有效沉默目的基因的转录水平.

2.3 沉默 *GhEIN2* 降低了棉花对黄萎病的抗性

乙烯信号途径对植物的生长发育和逆境应答反应中具有重要的调控作用, *EIN2* 是乙烯信号途径中的正调控因子, 可以使乙烯信号向下游传递并激活下游基因, 完成应答反应^[37]. 在拟南芥抗黄萎病的过程中发现, 乙烯正调控因子 *EIN3* 可以增强植株对黄萎病的抗性, 而其他正调控因子如 *EIN2*, *EIN4* 等则减弱了植株对黄萎病的抗性^[19]. Xu 等人^[21]分析了棉

花被黄萎病菌侵染的应答反应过程, 感病品种和抗病品种中乙烯合成及应答基因(1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, ACO1), 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, ACS6), 乙烯不敏感因子 2(ethylene insensitive factor 2, EIN2)和乙烯响应因子 1(ethylene responsive factor, ERF1))表达模式的改变, 发现乙烯作为信号分子可激活防卫体系, 在棉花抗黄萎病中起作用. *GhEIN2*(55)为乙烯信号途径中的正向调控因子, 可使乙烯信号向下游传递, 从而完成乙烯应答反应^[37]. 本研究利用 VIGS 技术沉默棉花中的内源基因 *GhEIN2*, 接种大丽轮枝菌 V991 后, 植株的发病症状明显加重, 大部分叶片都失水、萎蔫, 甚至枯萎、脱落(图 3A); 而接菌后的空载体对照植株(图 3B)与接菌后的野生型植株(图 3C), 都表现出轻微的病症, 两者间无明显差异. 利用荧光定量 PCR

图 3 *GhEIN2* 基因沉默植株对黄萎病菌抗性的变化

A: *GhEIN2* 基因沉默植株+V991; B: 空载体 CLCrV(A+B)转化对照植株+V991; C: 野生型对照+V991; D: *GhEIN2* 基因的沉默效率检测结果; E: 相对病情指数测定结果; F: *GhEIN2* 组织特异性表达分析结果; *: 与对比差异显著, $P < 0.05$

技术对 *GhENI2* 基因的沉默效率进行了检测, 沉默植株中内源基因 *GhENI2* 转录水平下降了 46.06%, 表明有效沉默了棉花中的 *GhENI2* 基因(图 3D). 对植株进行病情指数统计结果显示, 接菌后的转化空载体植株的病指略高于接菌后的野生型植株, 但二者之间无显著性差异, 而沉默 *GhENI2* 基因接种黄萎病菌后, 病情指数较转化空载体植株和野生型植株的病指明显增加, 差异显著 $P<0.05$ (图 3E). 对植株中 *GhENI2* 基因进行组织特异性分析, 该基因在子叶和幼叶中大量转录, 茎、下胚轴、根部的转录水平相对较低, 说明该基因主要在叶部发挥作用(图 3F). 这些结果表明, *GhENI2* 基因可能通过调控乙烯代谢途径, 参与棉花对黄萎病的抗性, 在棉花对黄萎病的响应中起重要作用.

2.4 *GhDIR* 基因参与棉花对黄萎病的抗性

DIR 基因是一类植物病原应答诱导蛋白基因, 该

基因家族的成员大多受病菌诱导, 参与木质素合成及细胞木质化, 从而抵御病原菌的入侵、繁殖及扩展^[38,39]. 对黄萎病菌侵染过程中陆地棉 *DIR* 基因转录差异分析发现, 抗病品种中 *DIR* 基因家族转录早, 且比感病品种上调转录基因数量和转录水平较高, 这表明该基因家族参与棉花对黄萎病菌响应^[40]. Shi 等人^[9]从陆地棉 cDNA 文库中分离出 2 个 *DIR* 基因, 即 *GhDIR1*(FJ600364)和 *GhDIR2*(FJ600365), 对这两个基因研究发现 *GhDIR1* 主要在棉花下胚轴累积, 而 *GhDIR2* 则在棉花纤维中大量表达; 通过超表达技术研究这两个基因对黄萎病菌的响应, 结果显示, 在转基因棉花中 *GhDIR1* 超表达导致木质素含量的增加, 并增强了棉花对黄萎病菌的抗性.

本研究同样发现了一个 *DIR* 基因, 即 *Gh97*. 沉默棉花中内源基因 *GhDIR* 接种黄萎病菌后, 植株表现出更明显的发病症状, 大部分叶片枯萎、脱落, 有的植株甚至光杆、死亡(图 4A); 接菌后的转化空载体

图 4 *GhDIR* 基因沉默实验结果

A: *GhDIR* 基因沉默植株+V991; B: 空载体 CLCrV(A+B)转化对照植株+V991; C: 野生型对照棉花植株+V991; D: *GhDIR* 基因沉默效率检测结果; E: 相对病情指数测定结果; F: *GhDIR* 基因的组织特异性表达分析结果; G: 利用 Mega 聚类分析 *GhDIR* 结果; *: 与对照比差异显著, $P<0.05$

植株(图 4B)与接菌后的野生型植株(图 4C), 二者之间的病症无明显差异, 只有一些植株显示出病症, 大部分植株生长良好. 荧光定量 PCR 技术检测棉花中 *GhDIR* 基因转录水平, 发现沉默植株中 *GhDIR* 转录水平下降了 67.47%, 说明利用 VIGS 技术有效沉默棉花内源基因 *GhDIR* 的表达(图 4D). 统计病情指数结果显示, 沉默植株接种黄萎病菌后, 其病情指数显著性增加, $P<0.05$, 而接菌后的转化空载体植株与接菌后的野生型植株病情指数无显著性差异(图 4E). 对植株中 *Gh97* 进行组织特异性表达分析发现, *GhDIR* 在根部的转录水平很高, 下胚轴、茎、子叶、幼叶中则很低(图 4F). 与之前研究的同类基因做了聚类分析发现, *GhDIR* 与 *GhDIR1* 和 *GhDIR2* 分属不同家族, *GhDIR* 同 *GbDIR1* 和 *GbDIR2* 属于 DIRb/d 家族, 而 *GhDIR1* 和 *GhDIR2* 则属于 DIRe 家族(图 4G). 这些结果表明, *GhDIR* 可能在根部介导细胞发生木质化, 从而阻止了黄萎病菌的入侵及繁殖, 提高了棉花对黄

萎病菌的抗性.

2.5 沉默棉花内源基因 *GhXTH* 减弱其对黄萎病的抗病能力

木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(*XTH*), 是一种细胞壁松弛酶, 在植物细胞壁重构过程中起重要作用^[41]. 近期的研究表明, 该类基因参与植物的多个生长调控过程, 包括细胞延伸、根的生长以及逆境应答等^[42-44]. *GhXTH*(*Gh114*)是一种木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(*XTH*), 利用 VIGS 技术沉默棉花中 *GhXTH*, 在接种大丽轮枝菌 V991 后, 相对比接菌后转化空载体植株(图 5B)和野生型植株(图 5C), 其发病症状更为显著, 大部分叶片出现萎蔫、枯黄、脱落等病症(图 5A). 沉默效率检测结果显示, *GhXTH* 沉默植株中该基因的转录水平下降了 72%, 说明有效沉默棉花内源基因 *GhXTH* 的表达(图 5D). 病情指数统计结果表明, 转化空载体植株和野生型植株在接种黄萎病菌

图 5 *GhXTH* 基因沉默植株对黄萎病菌抗性下降

A: *GhXTH* 基因沉默植株+V991; B: 空载体 CLCrV(A+B)转化对照植株+V991; C: 野生型对照棉花植株+V991; D: *GhXTH* 基因沉默效率的检测; E: 相对病情指数测定结果; F: *GhXTH* 组织特异性表达分析结果; *: 与对照差异显著, $P<0.05$

后, 二者的病情指数无显著性差异, *GhXTH* 沉默植株接菌后, 病指则显著增加 $P<0.05$ (图 5E). 分析植株中 *GhXTH* 在各个组织中的表达, 该基因在根部转录水平很低, 下胚轴、子叶、茎中的转录水平相对较高, 幼叶中转录水平最高, 说明该基因主要在根部以外的组织中发挥作用 (图 5F). 这些结果说明, *GhXTH* 可能通过改变植物细胞壁的结构, 从而参与棉花对黄萎病菌的抗性.

此外, 本课题组还筛选到一些转录因子也参与了棉花对黄萎病的抗性反应, 即 *bZIP*, *GRAS*, *WRKY*, *NAC5*, 下一步将对这些基因进行深入研究, 并获取基因的全长序列, 从而进一步研究它们的功能及其调控机制. 虽然之前有许多报道表明, 苯丙烷代谢途径参与棉花对黄萎病的抗病过程^[5,6], 本研究中沉默参与苯丙烷代谢中的关键酶——苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL), 接种黄萎病菌

后, 并未使棉花对黄萎病的抗性显著下降.

3 结论

(i) 利用 CLCrV 诱导的基因沉默体系, 靶向性沉默叶绿素合成相关基因 *CHLI* 和 *CLA1*, 植株叶片表现出明显的黄化和白化表型, 且转化空载体植株与野生型植株对黄萎病菌抗性无明显差异, 说明该体系可用于陆地棉基因功能的研究; (ii) 对成功构建的 62 个沉默基因载体进行高通量筛选, 3 轮重复试验后, 共筛选出 8 个棉花抗、感黄萎病相关基因; 其中 6 个基因正调控棉花对黄萎病的抗性, 2 个基因负调控棉花对黄萎病的抗性; (iii) *Gh55* (乙烯正调控因子 *EIN2*), *Gh97* (*DIR*), *Gh114* (木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶, *XTH*), 靶向沉默这些基因并接种黄萎病菌后, 植株对黄萎病菌更为敏感, 说明这些基因参与棉花对黄萎病的抗性.

参考文献

- 1 沈其益. 棉花病害基础研究与防治. 北京: 科学出版社, 1992. 15–340
- 2 徐理, 朱龙付, 张献龙. 棉花抗黄萎病机制研究进展. 作物学报, 2012, 9: 1553–1560
- 3 Muhammad I. 棉花黄萎病抗性机制和防治技术. 北京: 中国农业科学院, 2013
- 4 Daayf F. Verticillium wilts in crop plants: pathogen invasion and host defence responses. Can J Plant Pathol, 2015, 37: 8–20
- 5 Xu L, Zhu L F, Tu L L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. J Exp Bot, 2011, 62: 5607–5621
- 6 Sun Q, Jiang H, Zhu X, et al. Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. BMC Genomics, 2013, 14: 852
- 7 Gao W, Long L, Zhu L F, et al. Proteomic and virus-induced gene silencing (VIGS) analyses reveal that gossypol, brassinosteroids, and jasmonic acid contribute to the resistance of cotton to *Verticillium dahliae*. Mol Cell Proteomics, 2013, 12: 3690–3703
- 8 Xu L, Zhang W W, He X, et al. Functional characterization of cotton genes responsive to *Verticillium dahliae* through bioinformatics and reverse genetics strategies. J Exp Bot, 2014, 65: 6679–6692
- 9 Shi H, Liu ZH, Zhu L, et al. Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) *dirigent1* gene enhances lignification that blocks the spread of *Verticillium dahliae*. Acta Bioch Bioph Sin, 2012, 44: 555–564
- 10 Yang J, Ji L L, Wang X F, et al. Overexpression of 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase gene from *Gossypium hirsutum* enhances *Arabidopsis* resistance to *Verticillium* wilt. Plant Cell Rep, 2015, 34: 1429–1441
- 11 Tian J, Zhang X Y, Liang B G, et al. Expression of baculovirus anti-apoptotic genes *p35* and *op-iap* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) enhances tolerance to *Verticillium* wilt. PLoS One, 2010, 5: e1421812
- 12 Li C, He X, Luo X Y, et al. Cotton *WRKY1* Mediates the plant defense-to-development transition during infection of cotton by *Verticillium dahliae* by activating jasmonate ZIM-domain1 expression. Plant Physiol, 2014, 166: 2179–2194
- 13 Yang C L, Liang S, Wang H Y, et al. Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*. Mol Plant, 2015, 8: 399–411
- 14 Fradin E F, Abd-El-Halim A, Masini L, et al. Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2011, 156: 2255–2265
- 15 Zhang Y, Wang X F, Ding Z G, et al. Transcriptome profiling of *Gossypium barbadense* inoculated with *Verticillium dahliae* provides a resource for cotton improvement. BMC Genomics, 2013, 14: 637

- 16 Qin J, Zhao J Y, Zuo K J, et al. Isolation and characterization of an ERF-like gene from *Gossypium barbadense*. *Plant Sci*, 2004, 167: 1383–1389
- 17 Duan H Y, Li F G, Wu X D, et al. Cloning and characterization of two EREBP transcription factors from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochemistry (Mosc)*, 2006, 71: 285–293
- 18 Zuo K, Qin J, Zhao J, et al. Over-expression *GbERF2* transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes. *Gene*, 2007, 391: 80–90
- 19 Pantelides I S, Tjamos S E, Paplomatas E J. Ethylene perception via *ETR1* is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 191–202
- 20 Wang F, Ma Y P, Yang C L, et al. Proteomic analysis of the sea-island cotton roots infected by wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Proteomics*, 2011, 11: 4296–4309
- 21 Xu L, Zhu L F, Tu L L, et al. Differential gene expression in cotton defence response to *Verticillium dahliae* by SSH. *J Phytopathol*, 2011, 159: 606–615
- 22 Tan X P, Liang W Q, Liu C J, et al. Expression pattern of (+)-delta-cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L. *Planta*, 2000, 210: 644–651
- 23 Luo P, Wang Y H, Wang G D, et al. Molecular cloning and functional identification of (+)-delta-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *Plant J*, 2001, 28: 95–104
- 24 Xu Y H, Wang J W, Wang S, et al. Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. *Plant Physiol*, 2004, 135: 507–515
- 25 Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 495–519
- 26 李小龙, 谢伶俐, 焦靖芝, 等. VIGS 技术在基因功能研究中的应用进展. *基因组学与应用生物学*, 2014, 6: 1401–1404
- 27 黄昌军, 钱亚娟, 李正和, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组研究中的应用. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42: 3–15
- 28 宋震, 李中安, 周常勇. 病毒诱导的基因沉默(VIGS)研究进展. *园艺学报*, 2014, 9: 1885–1894
- 29 Tuttle, J R, Idris A M, Brown J K, et al. Gemini-virus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol*, 2008, 148: 41–50
- 30 Gu, Z H, Huang C J, Zhou X P, et al. A versatile system for functional analysis of genes and microRNAs in cotton. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 638–649
- 31 Gao X Q, Wheeler T, Li Z H, et al. Silencing *GhNDR1* and *GhMKK2* compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt. *Plant J*, 2011, 66: 293–305
- 32 Gao X Q, Li F J, Li M Y, et al. Cotton *GhBAK1* mediates *Verticillium* wilt resistance and cell death. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 586–596
- 33 王省芬, 马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法. *棉花学报*, 2002, 4: 231–233
- 34 Zhang B L, Yang Y W, Chen T Z, et al. Island cotton *Gbve1* gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. *PLoS One*, 2012, 7: e5109112
- 35 葛晓萍, 石琰璟. 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法. *青岛科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 1: 6–8
- 36 涂礼莉, 张献龙, 刘迪秋, 等. 棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量 PCR 内对照基因的筛选. *科学通报*, 2007, 20: 2379–2385
- 37 Ji Y S, Guo H W. From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: *EIN2* bridges the gap in ethylene signaling. *Mol Plant*, 2013, 6: 11–14
- 38 Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, et al. A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14732–14737
- 39 Burlat V, Kwon M, Davin L B, et al. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry*, 2001, 57: 883–897
- 40 郭宝生, 师恭曜, 王凯辉, 等. 黄萎病菌感染下陆地棉 Dirigent-like 蛋白基因表达差异分析. *中国农业科学*, 2014, 22: 4349–4359
- 41 Van Sandt V S T, Suslov D, Verbelen J P, et al. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Ann Bot-London*, 2007, 100: 1467–1473
- 42 Choi J Y, Seo Y S, Kim S J, et al. Constitutive expression of *CaXTH3*, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang). *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 867–877
- 43 Maris A, Suslov D, Fry S C, et al. Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis* and their effect on root growth and cell wall extension. *J Exp Bot*, 2009, 60: 3959–3972
- 44 Hyodo H, Yamakawa S, Takeda Y, et al. Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, *XTH9*, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 473–482

High Throughput Screening of *Verticillium dahliae* Resistance Genes by VIGS Technology in Cotton

ZHENG Na^{1,2}, GUO AnHui^{1,2}, ZHAI WeiBo², GUO HuiMin^{1,2}, ZHANG ShanShan²,
ZHANG WenWei², JIAN GuiLiang², HAN Rong¹ & QI FangJun²

¹ College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

² the State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Cotton verticillium wilt, the most severe disease in cotton, is a soil-born vascular spreading fungus disease caused by *Verticillium dahlia* Kleb. Due to limitations of research materials and lack of research techniques, it is difficult to explore the molecular mechanism of cotton resistance to verticillium wilt at the genetic level. VIGS is a technology based on the concept of loss-of-function in genes, it provides a new opportunity to reveal functions of genes that participate in the cotton-*Verticillium dahliae* interaction. We selected 106 genes that are possibly involved in cotton resistance to verticillium wilt, then studied function of these genes through VIGS technology. Sixty-two vectors that silenced the target genes were successfully constructed. After screening for three times in independent experiments, we found three important genes related to cotton's resistance: a positive regulatory factor (*EIN2*) in ethylene signaling pathways, *DIR* (dirigent-like protein gene) in lignification, and *XTH* (xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase). Silencing these genes significantly increased the susceptibility to *V. dahlia*, indicating that these genes may be involved in resistance to verticillium wilt via different signaling pathways.

cotton, verticillium wilt, VIGS, high-throughput screening, resistance-related genes

doi: 10.1360/N052016-00035