DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20180454

扁桃AcCBF1基因VIGS载体构建与功能分析

宋 恬',田 嘉',李 鹏',刘梦婕',张 琦',郭长奎2*,李 疆1*

('新疆农业大学,乌鲁木齐 830052; '浙江农林大学农业与食品科学学院,杭州 311300)

摘要:【目的】利用 VIGS(TRV-mediated Virus Induced Gene Silencing)方法沉默扁桃(Amygdalus communis L.)Ac-CBF1 基因表达,并初步探讨 AcCBF1 对低温条件下花药发育的调控。【方法】从'纸皮'扁桃花药中克隆 AcCBF1 基因 (729 bp),并设计4个不同长度(729、345、464、270 bp)的AcCBF1 基因片段,连接到pTRV2载体上,构建 VIGS 载体,转 化根瘤农杆菌 GV3101,并用注射法侵染到扁桃花蕾内。对侵染的花器官低温处理,用半定量 PCR 和荧光定量 PCR 分 析 AcCBF1 基因表达,以及对花器官表型进行初步分析。【结果】成功构建了 3 个 AcCBF1 基因沉默表达载体,pTRV2-AcCBF1_和 pTRV2-AcCBF1,能显著沉默扁桃花药中 AcCBF1 的表达;低温处理后这两组处理的扁桃花瓣小且颜色浅, 花芽和花药鲜重轻且小,与对照相比差异显著。【结论】AcCBF1 在调控低温条件下对花器官表型指标发挥重要作用。 该研究结果可为扁桃生殖期抗冻相关基因的功能验证和分子调控机制研究提供重要的参考和技术支持。 关键词:扁桃:AcCBF1;VIGS;低温;花器官

中图分类号:S662.9 文献标志码:A 文章纲

文章编号:1009-9980(2019)04-0421-09

Vector construction and functional analysis of *AcCBF1* using VIGS method in almond flower organs

SONG Tian¹, TIAN Jia¹, LI Peng¹, LIU Mengjie¹, ZHANG Qi¹, GUO Changkui^{2*}, LI Jiang^{1*}

(⁴Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China; ²School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] To clone some fragments of the almond AcCBF1 gene and construct the gene silencing vector pTRV2-AcCBF1 mediated by tobacco rattle virus, preliminary study was carried out on the AcCBF1 regulation of flower organ development under low temperature conditions, so as to lay a theoretical foundation for the breeding of hardy-resistant varieties and further study on gene function verification. [Methods] The target gene fragment was cloned from the anther of 'Zhipi' almond by RT-PCR. After the constructed expression vector was transfected into Agrobacterium GV3101, the anthers were infected by means of injection and vacuum infection. The empty vector control and infested shoots were placed in an artificial climate chamber with 70% relative humidity for hydroponics until the budswell stage(16 h during the day, 23 °C, 8 000 lx; 8 h at night, 15 °C, 0 lx). After the end of the night mode, the artificial climate box was adjusted to 10 °C, 0 lx, 12 h. Then, the anthers of 30 branches of each treatment group were stripped and stored with liquid nitrogen. The remaining branches were transfered to the gradient refrigerator at 4 $^{\circ}$ C · h⁻¹ to 0 $^{\circ}$ C 0 $^{\circ}$ C 3 h and -2 $^{\circ}$ C 2 h. The remaining shoots were warmed at 4 $^{\circ}$ C \cdot h⁻¹, and the culture was continued to observe the phenotypic changes of the branches. Semi-quantitative and fluorescence quantitative analysis were performed with RNA using RT-PCR and q RT-PCR, using *PdActin1* as an internal reference gene. The silencing effect of the VIGS system on the AcCBF1 gene was evaluated by phenotypic observation, semi-quantitative and fluorescence quantitative detection. [Results] The results showed that: (1) The expression level of AcCBF1 after low temperature treatment was significantly higher than that before treatment, and there was a significant difference be-

作者简介:宋恬,女,在读硕士研究生,主要研究方向为果树栽培与生理。Tel:13565899324,E-mail:1198626884@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:lijiangxj@163.com;E-mail:guock@zafu.edu.cn

收稿日期:2018-11-19 接受日期:2019-01-16

基金项目:国家自然科学基金(31660562);新疆自治区园艺学重点学科基金(2016-10758-3)

tween each treatment and the no-load control after low temperature treatment. The expression of Ac-*CBF1* gene in almond anther was analyzed by real-time PCR. The results showed that the expression of AcCBF1 gene was significantly up-regulated in anther after low temperature treatment, reaching 2.6 times more than that before treatment. This indicated that AcCBF1 may also played a role in regulating the cold stress response to almond flower branches; (2) Four AcCBF1 gene fragments with different sizes were cloned and sequenced to construct subsequent vectors. The final sequencing result of the insert of 750 bp, 350 bp and 250 bp was consistent with the published gene sequence and can be used to construct a viral vector. The 450 bp sequence of the insert had only 30% homology with the original sequence, so that this fragment was not selected for subsequent vector construction; (3) The Agrobacterium containing pTRV1:pTRV2 and pTRV1:pTRV2-AcCBF1... was mixed in equal amounts, and the amygdala was infested by vacuum infestation and injection. The results showed that the flower buds were easily detached, and the subsequent experiments could not be continued. In the subsequent experiments the injection method was used to infect the flower branches; (4) Verifying gene silencing efficiency was conducted by semi-quantitative PCR and real-time PCR. The silencing of AcCBF1 by pTRV2-AcCBF12 and pTRV2-AcCBF14 was better, and the expression level of the gene decreased by about 30% compared with the control. Infecting flower branches by injection can effectively silence the expression of AcCBF1 gene, and also prove that the Amygdalus VIGS system was successfully constructed. (5) After low-temperature treatment of VIGS-treated almonds, the infecting pTRV2-AcCBF12,4 could be found in the empty vector control petals that were less open and the petals were smaller. Further collection of various tissues for quality determination revealed that the quality of the flower organs decreased after the AcCBF1 gene was silenced. The shape of the petals and anthers was also evaluated. It was found that the decrease of the AcCBF1 gene caused the longitudinal diameter and diameter of the petals to decrease significantly compared with the control; the longitudinal diameter, transverse diameter and lateral diameter of the anthers were also reduced. [Conclusion] In this study, the VIGS silencing system based on tobacco fragile virus (TRV) was established on the almond flower organ for the first time. The amygdalin carrying pTRV2-AcCBF1 was successfully used to infect the almond flower organ and the silencing effect appeared. The experiment initially proved that AcCBF1 played an important role in flower organ development due to the regulation of low temperature. The results can not only provide technical support for the identification of the downstream regulatory genes of AcCBF1 in almonds, but also lay a theoretical foundation for the discovery of the mechanism of *AcCBF1* gene in the development of almond flower organs. Key words: Almond ; AcCBF1 ; VIGS ; Low temperature ; Flower organ

扁桃(Amygdalus communis L.)是新疆特色果树 树种之一,其产量稳定和品质提高是农民收入的重 要保障^[1],但近年来南疆冬季低温冻害严重影响了 扁桃的生长发育乃至产业发展。研究发现,不同扁 桃品种间抗冻能力存在差异,而且不同器官对冷的 耐受程度也不一样。与枝条比较,扁桃花芽更容易 受到冻害^[2]。其中,扁桃生殖器官的抗寒性由弱到 强分别为花药、花瓣、花萼、鳞片^[3]。调查发现,极端 低温使扁桃花芽大量僵化形成僵芽并最终脱落,即 使开放也不能坐果,严重时会使扁桃产量减产70% 以上。因此,探索扁桃生殖器官响应低温的机制研 究刻不容缓。

为了适应低温环境,扁桃进化出一系列机制去抵 挡低温对自身的损害。在发育过程中,扁桃通过改变 其生长发育进程,逃避冷对机体的损伤。随着温度的 逐渐降低,野扁桃和栽培扁桃花药、胚珠原基细胞逐 渐变大,达到一定温度后,又缓慢减小⁽⁴⁾。在生理生化 方面,扁桃通过增加体内可溶性糖含量、总蛋白质含 量、脯氨酸含量和SOD、POD等酶活力,以及减少 MDA含量来改善细胞膜系统和内环境的稳定性^[5-6]。 在分子生物学层面,扁桃通过提高*SIZ1、ICE1、CBF/ DREB1、WRKY21、HOS1*和*ANK*等抗冻相关基因表 达水平,并形成调控网络系统响应冷胁迫^[7]。

在基因调控网络中,*CBF*转录因子家族在调控 植物低温响应中发挥重要功能。*CBF*家族首先在拟 南芥中被发现,它们包含高度保守的AP2/ERF结构 域^[8]。*CBF*基因在低温条件下迅速上调表达,并引 起*RD17*,*ERD10*,*KIN1*,*COR6.6*,*KIN2*等下游基因 表达变化^[9]。*CBF*介导的冷信号通路在物种间高度 保守^[10]。过表达*CBF*不仅可以提高拟南芥的抗冻 性,也能提高杨树等的抗寒能力,敲除或下调*CBF* 的表达使植物的抗冻性明显下降^[11]。在果树中*CBF* 也是受冷的诱导,也可能在调控冷适应中发挥重要 功能,但相关研究却相对滞后。

果树童期长、转化效率低,进行转基因验证难度 较大,远不如其他农作物112。而病毒诱导的基因沉 默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术不需要 转基因,它是利用反向遗传学鉴定植物中各式各样 的基因,具有操作简单、周期短、沉默效率高、经济实 惠等优点,这个过程不需要通过组织培养再生植株 或者生产稳定转基因植株,从而大大节省了物种基 因功能分析所需时间^[13]。VIGS可以在果树幼苗、 花、茎以及果实等器官中进行[14-15],且已应用在植物 逆境发育、代谢调控、信号传导等相关基因功能鉴定 方面^[16]。虽然 VIGS 载体在不同植物中已经日渐成 熟,但也受沉默效率以及沉默持续时间的局限¹⁷⁷。 本研究以新疆主栽扁桃品种'纸皮'花器官为试材, 克隆扁桃AcCBF1基因片段,构建携带AcCBF1基因 报告的重组TRV2病毒载体并侵染扁桃花器官,观 测其在扁桃花器官抵抗低温机制中的作用,以解析 AcCBF1 基因在调控低温下扁桃花器官发育中的重 要功能,为干寒地区扁桃抗寒栽培提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 本试验以新疆维吾尔自治区轮台 县国家果树资源圃的'纸皮'扁桃为试验材料,采样 时间为2018年3月20日,选择树龄相当和生长发育 良好的3株'纸皮'扁桃树,每棵树均匀剪取200个一 年生结果枝(共600个)带回实验室,4℃保存。

1.1.2 菌株及质粒 大肠杆菌(Escherichia coli) DH5α和根瘤农杆菌(Agrobacterium tumefaciens) GV3101为实验室保存材料;TRV载体质粒由浙江农 林大学陈雯博士惠赠;克隆载体pEASY-Blunt Simple Cloning Kit购自北京全式金生物技术有限公司。 1.1.3 酶类及试剂 限制性内切酶、T₄ DNA连接酶 购自 NEB(北京)、第一链 cDNA Synthesis 试剂盒购 自 Thermo Fisher 公司(上海);RNAprep Pure 多糖多 酚植物总 RNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒、 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等购自 Tiangen 公司、 DNA Marker DL 2000 购自北京全式金生物;其他常 规化学试剂均为国产分析纯。PCR 引物由北京鼎国 昌盛生物技术限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因片段的克隆 根据GenBank公布的 扁桃 AcCBF1 基因全长序列(登录号 JQ317157),按照 VIGS 载体目的基因片段的选择原则,用 Primer 5 软件^[18]设计 VIGS: AcCBF1 特异性引物为片段大小 不同的 4 对,在上游引物和下游引物的 5'端分别引 入 EcoRI 和 BamHI 酶切位点,引物序列见表 1。以

表 1 本实验所用引物 Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	片段大小	
Name of primer	Sequences of primers $(5'-3')$	Fragment size/bp	
AcCBF1-1F	CGGAATTCATGAACAGGTTCTTCTCTCATTT	729	
AcCBF1-1R	CGGGATCCTTAATTGGAGAAACTCCACAATT		
AcCBF1-2F	CGGAATTCTTGCCTGCCTCAACTTCCCTGAC	345	
AcCBF1-2R	CGGGATCCTCCCAAATGTCGCCACCTAAGC		
AcCBF1-3F	CGGAATTCAGGAGGAACAATGACAAGTGGGTG	464	
AcCBF1-3R	CGGGATCCCTAAGCATTGAGGTGGAGAAAG		
AcCBF1-4F	CGGAATTCACAACACAGTCACGACTCTAAG	270	
AcCBF1-4R	CGGGATCCGCTTCCCTCTAAACGCCAATGC		
PdActin1-F1	AGCAAGGTCCAGACGAAGAA	385	
PdActin1-R1	TGTAGGTGATGAAGCCCAATC		
q Actin1-F1	GAGACCTTCAATGTGCCTGC	104	
q Actin1-R1	ACACCATCACCAGAGTCCAG		
q AcCBF1-F	TGAGAGAGCCCAAGAAGACG	111	
<i>q AcCBF1</i> -R	CAAGCTTCCCTCTAAACGCC		

注:下划线部分为酶切位点和保护碱基。Note: Underlined part is the enzyme cleavage site and protected base.

'纸皮'扁桃花药总RNA为模板,使用Thermo Fisher 公司反转录试剂盒(Reverse transcription system 合 成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增,扩增体系 和扩增条件参照 Pyrobest DNA Polymerase (TaKa-Ra)操作说明。PCR产物纯化回收按照Tiangen公 司(北京)琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的操作方法 进行。

1.2.2 重组载体的构建 将目的基因片段与 pTRV2病毒质粒载体同时用 EcoRI和 BamHI 双酶 切,回收酶切产物,用T₄连接酶16℃过夜反应,转化 DH5α,卡那霉素(50 μg·mL⁻¹)筛选,菌液 PCR 鉴定 阳性克隆并测序验证,即重组载体pTRV2-AcCBF1, pTRV2- AcCBF12、pTRV2- AcCBF13 和 pTRV2- Ac-CBF14,重组载体结构如图1所示。





1.2.3 扁桃沉默体系的建立及处理过程 病毒载体 pTRV2-AcCBF1、pTRV2、pTRV1通过冻融法转入农 杆菌 GV3101。用5 mL LB 培养基(25 µg·mL⁻¹ Gen, 50 µg·mL⁻¹ Rif 和 50 µg·mL⁻¹ Kan)220 r·min⁻¹,28 °C 过夜震荡培养。再用 50 mL LB 培养基(20 µg·mL⁻¹ Gen, 50 μ g · mL⁻¹Rif, 50 μ g · mL⁻¹Kan, 10 mmol · L⁻¹ MES和20 mmol · L⁻¹乙酰丁香酮)220 r · min⁻¹,28 ℃ 扩大过夜培养,离心收集菌体后,加入侵染液(含10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol \cdot L⁻¹ MES, 200 mmol \cdot L⁻¹ 乙酰丁香酮)悬浮菌体,调节OD600值为1.0,室温静 置 3 h。将分别含有 pTRV2-AcCBF1、pTRV1 的 GV3101以1:1的比例混合均匀,阴性对照为含 pTRV2、pTRV1的GV3101以1:1混合菌液。采摘露 红期的结果枝用一次性无菌注射器对枝条上花蕾注 射侵染[14,19]和抽真空渗透侵染[20-21]。

空载 pTRV2: pTRV1 和重组载体 pTRV2-Ac-CBF1,、pTRV2-AcCBF12、pTRV2-AcCBF14 各侵染 150个枝条(共600个)。将空载和侵染的结果枝放 置在湿度70%的人工气候箱内水培[22]至大蕾期(白 天 16 h, 23 ℃, 8 000 lx; 夜晚 8 h, 15 ℃, 0 lx), 于夜 晚模式结束后将人工气候箱调成10℃,0lx,12h后 分别剥取各处理组30根开花枝上的花药,液氮保 存。并将剩余结果枝转移至梯度冰箱内,4℃·h⁻¹降 温至0℃,0℃3h,-2℃2h^[23],取样(同上)。将剩 余结果枝4℃·h⁻¹升温后继续培养,观察扁桃其表型 变化。

1.2.4 半定量和 q RT-PCR 检测 以 PdActin1(登录 号为AM491134)为内参,表1中AcCBF1(1F1R;2F 2R; 4F 4R)为引物应用 RT-PCR 对 RNA 进行半定量 分析;根据AcCBF1基因3个插入片段设计荧光定量 引物 qAcCBF1 和内参基因 qActin1(见表1),应用 qRT-PCR对RNA进行荧光定量分析。分别从侵染 的pTRV2-AcCBF11,2,3,4和空载(pTRV2:pTRV1)扁桃 花药中提取RNA并反转录成cDNA。进行半定量 和荧光定量检测,半定量PCR扩增程序及体系同上 目的基因克隆时的扩增程序相同,但只对AcCBF1 和PdActinl进行28个循环;荧光定量使用仪器BIO-RAD CFX Connect[™] 进行荧光定量 PCR 检测,反应 程序为:95 ℃ 3 min:95 ℃ 10 s,57 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,75 ℃ 5 s,40 个循环。每个样品设3 个重复。采用 2^{-△△CT}法分析数据。

结果与分析 2

2.1 扁桃 AcCBF11,2334 基因片段的克隆

以'纸皮'扁桃花药 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,可见

750、350、450、250 bp 左右的 *AcCBF1*_{1,2,3,4} 片段(图 2), 扩增条带清晰, 大小与预期一致。分别回收 *AcCBF1*_{1,2,3,4} 基因片段, 并与 pEASY-Blunt Simple 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 菌液 PCR 阳性菌 落提取质粒并送测序, *AcCBF1*₃测序结果与原序 列不符,因此此片段不选择做后续载体构建片段。 并用 EcoRI 和 BamHI 限制性内切酶消化验证。 结果显示,消化后的质粒 pEASY-AcCBF1, pEASY-AcCBF12和 pEASY-AcCBF14均能有目的条带出现 (图3)。



M. DNA Marker; 1-4: AcCBF1, AcCBF1, AcCBF1, AcCBF1, AcCBF1,

图 2 不同大小 AcCBF1 基因片段的 PCR 扩增 Fig. 2 Different sizes of AcCBF1 gene fragments



M. DNA 标准分子质量;1、2、4. EcoRI/BamHI 双酶切 pEASY-CBF1_{12.4}.

M. DNA Marker; $1 \ge 2 \le 4$. Double digested products of pEASY-CBF1_{1,2,4}.

图 3 重组载体 pEASY-CBF1_{1,2,4}双酶切验证 Fig. 3 Identification of recombinant vector pEASY-CBF1_{1,2,4} by double digestion

2.2 扁桃基因沉默载体的构建与转化

把酶切后的*CBF1*不同大小片段(图3)回收后, 与用*Eco*RI和*Bam*HI消化的pTRV2线性载体用T₄ DNA连接酶相连,转化DH5α,获得阳性克隆,提取 质粒经*Eco*RI和*Bam*HI消化(图4)以及测序鉴定, 结果显示pTRV2-*AcCBF1*载体构建成功。把构建好 的 pTRV2-*AcCBF1*_{1,2,4}载体分别转化农杆菌 GV3101,PCR验证获得阳性克隆(图5)。

把含 pTRV2 或 pTRV2-AcCBF1,2.4和 pTRV1 的 农杆菌等量混合,采用抽真空侵染和注射法侵染扁桃花蕾。结果显示,抽真空侵染扁桃枝条花芽极易



M. DNA 标准分子质量;1、2、4. EcoRI/BamHI 双酶切 pTRV2-Ac-CBF11.2.4.

M. DNA Marker; 1, 2, 4. Double digested products of pTRV2-Ac-CBF1_{1,2,4}

图 4 病毒载体 pTRV2-AcCBF1,,2,4 双酶切验证 Fig. 4 Identification of viral vector pTRV2-AcCBF1, 2, 4 by double digestion

脱落,无法继续后续试验;后续试验采用注射法侵染 扁桃花蕾。

2.3 AcCBF1基因的表达量分析

选取不同农杆菌侵染并冷处理的扁桃花药,分 别用半定量 PCR 和荧光定量 PCR 进行验证基因的 沉默效率。半定量 PCR 结果表明(图 6-A),与空载 体对照相比,pTRV2-AcCBF1₂和 pTRV2-AcCBF1₄沉 默AcCBF1效果较好;进一步用荧光定量 PCR 方法 对沉默效率进行分析(图 6-B),结果显示与对照相 比 pTRV2-AcCBF1₂和 pTRV2-AcCBF1₄使 AcCBF1 基 因的表达下降 30%左右,而且存在极显著的差异。







与正常情况相比,差异极显著**(α = 0.01)。 0. pTRV2:pTRV1;2. pTRV2-*AcCBF1*₂;4. pTRV2-*AcCBF1*₄。

Compared to normal condition, extreme difference ** (α = 0.01). 0. pTRV2:pTRV1; 2. pTRV2-*AcCBF1*₂; 4. pTRV2-*AcCBF1*₄.

图 6 扁桃 AcCBF1 基因的半定量和 qRT-PCR 荧光定量 分子检测

Fig. 6 Semi-quantitative and qRT-PCR fluorescence quantitative molecular detection of *AcCBF1* gene in almond

以上结果提示,通过注射法侵染扁桃花药,可以有效 沉默 AcCBF1 基因的表达,也证明了扁桃花药 VIGS 体系构建成功。

2.4 AcCBF1影响低温条件下扁桃花器官表型

低温处理VIGS处理的扁桃花枝,可以发现侵染pTRV2-AcCBF12.4较空载体对照花瓣开放程度低且花瓣较小(图7)。进一步收集各个组织进行鲜质量测定,发现AcCBF1基因沉默后花器官鲜质量下降,花芽鲜质量只有对照的67.8%~80.0%,单花瓣鲜

质量是对照的46.9%~62.5%,而花药鲜质量为对照的61.7%~78.5%(表2)。对花瓣和花药的形状进行评估,发现与对照相比AcCBF1基因下降导致花瓣纵径(12.19 mm vs 9.24和7.27 mm,对照在前)、直径(8.45 mm vs 6.64和4.44 mm)都显著变小,花药的纵径(1.71 mm vs 1.33和1.32 mm)、横径(1.20 mm vs 0.96和1.05 mm)、侧径(0.58 mm vs 0.51和0.50 mm)也都显著变小(表3)。以上结果表明,AcCBF1基因表达下降影响了扁桃低温条件下花器官的表型指标。



 pTRV2: pTRV1; 2. pTRV2- AcCBF1; 3. pTRV2- AcCBF12; 4. pTRV2-AcCBF14

图 7 VIGS 沉默表型鉴定 Fig. 7 VIGS silent phenotype identification

3 讨 论

CBF是调控低温下植物花发育的关键基因。本研究发现,AcCBF1基因的沉默导致扁桃花瓣和花

	Table 2 Analysis of the question	ality of infected flower organ	nfected flower organ		
处理	花芽鲜质量	单花瓣鲜质量	花药鲜质量		
Deal with	Flower bud quality/g	Single petal quality/g	Anther quality/g		
pTRV2:pTRV1	0.094 5±0.025 7 aA	0.006 4±0.002 4 aA	0.010 7±0.003 3 aA		
pTRV2-AcCBF12	0.075 6±0.013 4 bB	0.004 0±0.001 1 bB	0.008 4±0.001 6 bB		
pTRV2-AcCBF14	0.064 0±0.015 0 cB	0.003 0±0.001 1 cB	0.006 6±0.001 4 cC		

表 2 侵染后花器官鲜质量对比分析

注:同列不同大小写字母表示处理间在 p < 0.01 和 p < 0.05 上差异的显著性。下同。

Note: Different captial and small letters in the same column indicate significant difference at p < 0.01 and p < 0.05 between treatments. The same below.

表 3 侵染花枝的花瓣花药的表型性状 Table 3 Infect flower branch phenotype characters

处理 Deal with	花瓣纵径 Petal longitudinal/ mm	花瓣直径 Petal diameter/ mm	花药纵径 Anther longitudinal/ mm	花药横径 Anther transverse diameter/mm	花药侧径 Anther side diameter/mm
pTRV2:pTRV1	12.19±2.14 aA	8.45±1.38 aA	1.71±0.22 aA	1.20±0.12 aA	0.58±0.13 aA
pTRV2-AcCBF12	9.24±1.44 bB	6.64±0.84 bB	1.33±0.15 bB	0.96±0.13 cB	0.51±0.10 bAB
pTRV2-AcCBF14	7.27±1.27 cC	4.44±0.79 cC	1.32±0.14 bB	1.05±0.11 bA	0.50±0.09 bB

药发育延迟,甚至会导致花粉的不育。Pedro等^[24]在研究扁桃冷驯化与花器官发育途径中为*CBF*介导的低温信号在果树花蕾中的作用提供了第一个分子证据,连续2年在枝条和花蕾中进行的基因表达分析表明*PdCBF1*,*PdCBF2*和*PdDHN1*在冷驯化过程中是活跃的。*CBF1*是第一个在植物中表达的冷响应基因,触发冷反应途径并帮助植物抵抗低温胁迫^[25]。本研究经过低温胁迫后发现,扁桃花药*AcCBF1*表达量与对照相比显著上升,而有效沉默后的扁桃花药*AcCBF1*的表达量与对照相比呈下降趋势,但仍比低温前的表达量高。这可能是*AcCBF1*基因沉默后受到低温胁迫抑制了植株的表达,与王镇^[26]在不结球白菜*BcCBF3*基因沉默载体建立后的表达分析相一致。

TRV-VIGS技术已经成功运用于多种果树基因 功能的研究^[27],如沉默白色果肉桃中CCD4基因,发 现CCD4的表达是桃果肉呈现白色的主要因素^[28]; 草莓VIGS体系的建立,使其叶片和果实出现光漂 白现象,PDS基因表达量下降,为其研究基因功能提 供新的技术^[29];苹果果实中VIGS的构建,确定了花 青素合成的关键基因以及果实乙烯合成关键基因的 表达^[30-31];还有在甜樱桃^[32]、荔枝^[33]等多种果树中都 已成功构建了VIGS体系,可见VIGS技术对果树基 因功能的研究有着重要意义。但在果树花中的沉默 报道略少,本研究试验以CBF基因为研究对象,构 建了'纸皮'扁桃VIGS技术体系,根据前人的方法 研究,选择了注射法和真空渗透法两种侵染方式,更 好地分析其沉默后的花器官表型以及 CBF 基因表 达量的变化。但经试验发现,真空渗透并不适用于 离体培养的扁桃枝条上花药的侵染,易造成花芽掉 落。而注射法对于注射花药有一定难度且需费大量 劳动力,注射法压力小,花药接触菌液渗透量少,这 可能是沉默花器官表型效果不明显的一个原因,今 后还可尝试多种侵染方式来探明表达效果。

病毒诱导的基因沉默(VIGS)是研究基因功能 中一种快速、高效、简单的方法,但在一些方面(如病 毒载体、插入的靶基因片段、环境条件控制和植株苗 龄等)有较高的要求^[34]。TRV 是效率和持久性较好 的病毒载体,此载体介导的VIGS体系已成功地在 桃子的叶片、果实中得以研究应用,本研究中构建了 基于 TRV 的 VIGS 沉默载体, 对扁桃花药进行了沉 默,进行侵染试验并获得成功。一般认为,比较理想 的片段大小为150~500 bp,而且插入片段与目的基 因至少要有连续23 bp完全相同,因为VIGS的效果 是基于序列同源性,两者序列同源性越高,基因沉默 效果越好^[16,35]。本研究中插入的AcCBF1基因片段 大小为270~750 bp,在片段大小为270 bp和345 bp 的AcCBF1沉默效果较好,表达量降低,这与前人的 研究结果[16,23,36]相同。在750 bp 片段大小的 AcCBF1 没有出现沉默效果,这可能是由于插入片段长度阻 碍了病毒在植物细胞之间的移动[24],影响其复制传 播使其沉默效果持续时间短。沉默效率的高低不仅 仅取决于插入片段的大小,还和多种因素有密切关 系。环境因子中温度和湿度是VIGS沉默效果中最

重要的影响因素,因植物种类不同,有效沉默的温湿 度要求也不同。番茄较好的沉默表型在21℃或更 低的温度下发生^[16,37],本氏烟适宜的温度在25℃左 右^[16,38]。本研究中发现,在晚上15℃、白天22~25℃、 湿度70%以上进行扁桃结果枝的VIGS侵染,可产生 有效的沉默效果。由于VIGS重组病毒对基因暂时 沉默,有效沉默期可达1个月^[39],而本试验由于在花 期侵染后达到花芽开花温度,沉默目的基因时间只 有1周左右,这可能是沉默效率不明显的一个原因, 因此在花药中达到有效沉默时间有一定难度。

VIGS 会引起植株在各个部位的基因沉默效率 不均一的现象,而且不同的植株间沉默水平也可能 不同,甚至有些沉默植株只在局部组织有表型,这均 不利于试验结果的分析,难以达到彻底抑制基因表 达的效果^{177]}。本试验利用人工气候箱对扁桃结果枝 条进行离体培育,在侵染过程中由于空间、时间受 限,其侵染片段大小不同的枝条在菌液侵染过程中 可能造成互相干扰,且对人工气候箱必须严格控制 环境条件,难度较大。由于花期较短,花药外有较坚 硬的鳞片,难免存在少许部位没有接触到病毒接种 液或浓度不均匀等问题,今后可优化试验方案,尝试 多种侵染方式,更好地获得其侵染效果。

4 结 论

本研究首次在扁桃花器官上建立以烟草脆裂病毒(TRV)为载体的 VIGS 沉默体系,成功用携带 pTRV2-AcCBF1 的农杆菌侵染扁桃花器官且出现沉 默效果。试验初步证明AcCBF1 在调控低温条件下 扁桃花器官表型指标中发挥重要功能。研究结果可 为鉴定扁桃花器官AcCBF1 下游调控基因提供技术 支持,为探明AcCBF1 基因在扁桃花器官发育中的 机制奠定理论基础。

参考文献 References:

[1] 李疆.中国果树科学与实践:阿月浑子、扁桃篇[M].西安:陕 西科学技术出版社,2015:38-50.

LI Jiang. Science and practice of chinese fruit trees-pistachio, almonds[M]. Xi'an: Shanxi Science and Technology Press, 2015: 38-50.

- [2] 李鹏. 扁桃花蕾抗寒性分析和花药开裂过程观察[D]. 乌鲁木 齐:新疆农业大学,2015.
 LI Peng. Analysis on cold resistance of almond buds and observation of the dehiscence process of almond anthers[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University,2015.
- [3] 李鹏,田嘉,许娟,罗淑萍,李疆.鹰咀扁桃花蕾在低温应激反

应中糖含量的变化[J]. 经济林研究, 2016, 34(2):62-66.

LI Peng, TIAN Jia, XU Juan, LUO Shuping, LI Jiang. Changes of sugar content in flower buds of Yingzui almond in low temperature stress reaction[J]. Nonwood Forest Research, 2016, 34 (2): 62-66.

[4] 钟海霞,陆婷,刘立强,李疆,李古权.不同低温胁迫下野扁桃
 与栽培扁桃花原基解剖结构观察[J].西北农业学报,2013,22
 (12):112-118.

ZHONG Haixia, LU Ting, LIU Liqiang, LI Jiang, LI Guquan. Observation of the anatomical structure of floral primordium of amygdalus ledebouriana schleche and A.*communis* L.cv.in different low temperature stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2013, 22(12): 112-118.

- [5] 李鹏,罗淑萍,田嘉,许娟,李疆. 低温冻害对扁桃花蕾抗寒机 制的影响[J]. 经济林研究,2015,33(2):20-25.
 LI Peng,LUO Shuping,TIAN Jia,XU Juan,LI Jiang. Effects of frozen injury on freezing-tolerance mechanism of flower buds in almond[J]. Nonwood Forest Research,2015,33(2): 20-25.
- [6] 李鹏,田嘉,唐开文,罗淑萍,李疆.基于隶属函数评估法的扁桃花蕾抗寒性研究[J].中南林业科技大学学报,2017,37(2): 39-43.

LI Peng, TIAN Jia, TANG Kaiwen, LUO Shuping, LI Jiang. Study on cold resistance of almond buds based on the subordinative function method[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2017, 37(2): 39-43.

- [7] ALISOLTANI A, SHIRAN B, FALLAHI H, EBRAHIMIE E. Gene regulatory network in almond (*Prunus dulcis* Mill.) in response to frost stress[J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11(5): 100-103.
- [8] ZHOU M Q, SHEN C, WU L H, TANG K X, LIN J. CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2011, 31 (2): 186-192.
- [9] 李科友,朱海兰. 植物非生物逆境胁迫 DREB/CBF 转录因子的研究进展[J]. 林业科学,2011,47(1):124-134.
 LI Keyou, ZHU Hailan. Research Progress of DREB/CBF Transcription Factor in Response to Abiotic-Stresses in Plants[J]. Scientia Silvae Sinicae,2011,47(1): 124-134.
- [10] LACOMME C. Milestones in the development and applications of plant virus vector as gene silencing platforms[M]. Plant Viral Vectors: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 89-105.
- [11] BENEDICT C, SKINNER J S, MENG R, CHANG Y, BHAL-ERAO R. The *CBF1*-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in populus spp[J]. Plant Cell & Environment, 2010, 29(7): 1259-1272.
- [12] 王新平,茹慧玲,孙慧英,王新生,杨兆亮,杨雪瑞.果树转基因研究进展[J].山西农业科学,2016,44(1):123-125.
 WANG Xinping, RU Huiling, SUN Huiying, WANG Xinsheng, YANG Zhaoliang, YANG Xuerui. Research progress of transgenic fruit trees[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016,44(1): 123-125.
- [13] YU J, YANG X D, WANG Q, GAO L W, YANG Y, XIAO D, LIU T K, LI Y, HOU X L, ZHANG C W. Efficient virus- induced gene silencing in Brassica rapa, using a turnip yellow mosaic virus vector[J]. Biologia Plantarum, 2018, 62(4): 826-834.
- [14] JIA H F, GUO J X, QIN L, SHEN Y Y. Virus-induced PpCHLH gene silencing in peach leaves (*Prunus persica*) [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2010, 85(6): 528-532.
- [15] JIA H F, CHAI Y M, LI C L, QIN L, SHEN Y Y. Cloning and

characterization of the H subunit of a magnesium chelatase gene (*PpCHLH*) in peach[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2011, 30(4): 445-455.

- [16] 宋震,李中安,周常勇.病毒诱导的基因沉默(VIGS)研究进展
 [J].园艺学报,2014,41(9):1885-1894.
 SONG Zhen,LI Zhongan,ZHOU Changyong. Research advances of virus-induced gene silencing(VIGS)[J]. Acta Horticulturae Sinica,2014,41(9): 1885-1894.
- [17] 刘美,刘莉铭,吴会杰,古勤生.VIGS 技术的研究进展及其在 葫芦科作物中的应用[J]. 果树学报,2018,35(11):1422-1429.
 LIU Mei, LIU Liming, WU Huijie, GU Qinsheng. Research progress in VIGS technology and its application in Cucurbitaceae crops[J]. Journal of Fruit Science,2018,35(11): 1422-1429.
- [18] 尤超,赵大球,梁乘榜,周春华. PCR 引物设计方法综述[J]. 现 代农业科技,2011(17):48-51.
 YOU Chao, ZHAO Daqiu, LIANG Chengbang, ZHOU Chunhua. Review of the PCR primer design method[J]. Modern Agricultural Technology,2011(17): 48-51.
- [19] BURCH-SMITH T, ANDERSON J, MARTIN G K S. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. Plant Journal, 2004, 39(5):734-746.
- [20] DING X S, SCHNEIDER W L, CHALUVADI S R, MIAN M A, NELSON R S. Characterization of a brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts[J]. Molecular Plant- Microbe Interactions, 2006, 19(11): 1229-1239.
- [21] YAN H X, FU D Q, ZHU B Z, LIU H P, SHEN X Y, LUO Y B. Sprout vacuum-infiltration: a simple and efficient agroinoculation method for virus-induced gene silencing in diverse solanaceous species[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(9): 1713-1722.
- [22] 李鹏,田嘉,张琦,董胜利,章世奎,李疆.扁桃离体枝条培养方式比较和筛选[J].中南林业科技大学学报,2018,38(5):23-27.
 LI Peng, TIAN Jia, ZHANG Qi, DONG Shengli, ZHANG Shikui, LI Jiang. Comparison and selection of almond branches *in vitro* culture[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2018,38(5): 23-27.
- [23] MOUSAVI S, ALISOLTANI A, SHIRAN B. De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress[J]. Plos One, 2014, 9(8): 9-10.
- [24] BARROS P M, GONA §ALVES N, SAIBO N J, OLIVEIRA M M. Cold acclimation and floral development in almond bud break: insights into the regulatory pathways[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(12): 4585-4596.
- [25] MARYAM K, ALI E, AMIR M S, ABDOLKARIM Z. Comparison of CBF1, CBF2, CBF3 and CBF4 expression in some grapevine cultivars and species under cold stress[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 197: 521-526.
- [26] 王镇.不结球白菜冷相关 CBF 基因的鉴定及调控路径[D].南京:南京农业大学,2015.
 WANG Zhen. Identification and regulation of cold-related CBF genes in non-heading Chinese cabbage[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural College,2015.
- [27] 闵德栋,张新华,季娜娜,李富军,邵淑君.TRV 介导的 VIGS 技术在果蔬基因功能研究中的应用[J].植物生理学报,2017,53(2):159-166.
 MIN Dedong, ZHANG Xinhua, JI Nana, LI Fujun, SHAO Shu-

jun. Application of TRV- mediated VIGS technology in gene function research of fruits and vegetables[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(2): 159-166.

- [28] BAI S L, TUAN P A, TATSUKI M, YAEGAKI H, OHMIYA A, YAMAMIZO C, MORIGUCHI T. Knockdown of carotenoid cleavage dioxygenase 4 (*CCD4*) via virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit: evaluation of gene function related to fruit traits[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(1): 257-264.
- [29] TIAN J, CHENG L, HAN Z Y, YAO Y C. Tobacco rattle virus medi-ated gene silencing in strawberry plants[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2015, 120(3): 1131-1138.
- [30] 王丽辉.苹果果皮花色苷代谢及相关基因的调控的研究[D]. 北京:中国农业大学,2014.
 WANG Lihui. Study on the anthocyanins metabolism and the regulation of relative gene in the fruit of apple[D]. Beijng:China Agricultural University,2014.
- [31] 温小红,姜永华,周轲,任小林.VIGS 诱导 MdHB-1 沉默对苹果果实成熟的影响[J].西北农业学报,2014,24(11):113-119.
 WEN Xiaohong,JIANG Yonghua,ZHOU Ke,REN Xiaolin. Effects of virus-induced MdHB-1 silencing on apple fruit ripping [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2014, 24(11): 113-119.
- [32] LI Q, CHEN P, DAI S, SUN Y F, YUAN B, KAI W B, PEI Y L, HE S H, LIANG B, ZHANG Y S. *PacCYP707A2* negatively regulates cherry fruit ripening while *PacCYP707A1* mediates drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66 (13): 3765-3774.
- [33] LI X J, ZHANG J Q, WU Z C, LAI B, HUANG X M, QIN Y H, WANG H C, HU G B. Functional characterization of a glucosyltransferase gene *LcUFGT1* involved in the formation of cyanidin glucoside in the pericarp of Litchi chinensis[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2015, 120(3): 1131-1138.
- [34] 赵祯,刘富中,张映,齐东霞,陈钰辉,连勇.茄子 SmMsrA 基因 VIGS 表达载体的构建及表达分析[J]. 园艺学报,2015,42(8): 1495-1504.

ZHAO Zhen, LIU Fuzhong, ZHANG Ying, QI Dongxia, CHEN Yuhui, LIAN Yong. VIGS expression vector construction and expression analyses of *SmMsrA* gene in eggplant[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(8): 1495-1504.

- [35] THOMAS C L, JONES L, BAULCOMBE D C, MAULE A J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA-directed methylation in N. benthamiana using a potato virus X vector[J]. Plant Journal, 2010, 25(4): 417-425.
- [36] 张新华,李富军.病毒诱导的基因沉默技术及其在植物中的研究进展[J].西北植物学报,2012,32(2):419-424.
 ZHANG Xinhua,LI Fujun. Reserach advances of Virus-induced gene silencing technology in plant[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2012,32(2): 419-424.
- [37] LIU Y, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. The Plant Journal, 2002, 31(6): 777-786.
- [38] NETHRA P, NATARAJA K N, RAMA N, UDAYAKUMAR M. Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector[J]. Current Science, 2006, 89(11): 431-435.
- [39] 张新华,季娜娜,闵德栋,邵淑君,李富军.VIGS 载体在果树中的应用研究进展[J]. 果树学报,2017,34(4):507-514.
 ZHANG Xinhua, JI Nana, MIN Dedong, SHAO Shujun, LI Fujun. Progress of research on application of VIGS vectors in fruit trees[J]. Journal of Fruit Science,2017,34(4): 507-514.