DOI:10.11721/cqnuj20250413

VIGS-HIGS 技术协同沉默大丽轮枝菌 *CYP51* 基因对烟草抗病能力的影响*

邹　润，谢成建
(重庆师范大学 生命科学学院，重庆 401331)

摘要:宿主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing,HIGS)近些年来被深入研究并应用到植物抗病育种中,然而该技术需要首先在宿主植物中建立针对病原菌目标基因的 siRNA。基于通过病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing,VIGS)技术能在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中快速产生 siRNA 的思路,构建了一个可同时沉默转基因本氏烟草 16c(后简称 16c-NB) *GFP* 基因及大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)*CYP51* 基因的融合片段,并将它插入到 VIGS 载体 TRV2 中,以实现在通过观察 16c-NB 绿色荧光是否消失来快速确认基因沉默效应是否发生的同时,也让 16c-NB 体内产生大量针对大丽轮枝菌 *CYP51* 基因的 siRNA。结果显示:16c-NB 在转入 TRV2:*GFP-CYP51* 载体后体内的 *GFP* 基因被沉默,且在接种大丽轮枝菌后的萎蔫病状明显低于作为对照的转入了 TRV2:*GFP* 载体的 16c-NB,说明通过 VIGS 技术让 16c-NB 产生的针对大丽轮枝菌 *CYP51* 基因的 siRNA 明显提高了该物种对大丽轮枝菌的抗性。上述基于 VIGS 技术建立的 TRV2:*GFP*-目标基因体系为快速筛选抗大丽轮枝菌的 HIGS 靶基因提供了高效工具。

关键词:宿主诱导的基因沉默(HIGS);病毒诱导的基因沉默(VIGS);*CYP51* 基因;本氏烟草;大丽轮枝菌
中图分类号:Q175　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-6693(2025)04-0111-08

siRNA(small-interfering RNA)、PIWI-interacting RNA[1]等 sRNA(small RNA)通过转录或转录后水平调控基因的表达[2]。sRNA 能以双链的形式在生物体内部进行短距离或长距离传递[2],还能跨物种进行传递[1]。例如,葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)可将自身的 siRNA 传递给拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)并沉默后者免疫相关基因,从而实现对后者的成功侵染[3];此外菟丝子(*Cuscuta pentagona*)与它的寄主植物之间也存在 sRNA 大量交流[4];甚至还有研究争论人(*Homo sapien*)血液中是否有植物源的 miRNA(microRNA)[5-7]。近些年来,基于植物 sRNA 跨物种沉默病原菌目标基因而发展起来的技术——宿主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing,HIGS)受到广泛关注[8],该技术通过在宿主植物中表达与昆虫或病原体基因相关的 hpRNA(hairpin RNA)或 dsRNA(double-stranded RNA),然后这些表达产物被宿主植物加工为 siRNA 后再传递到昆虫或病原体中,从而达到沉默昆虫或病原体相应基因表达之目的[9]。当前,HIGS 技术已经被广泛应用于有关防治植物病虫害的研究和实践中[10-18]。

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)是一种土传维管束真菌病害,能够导致双子叶植物萎蔫坏死;它在逆境条件下形成的微菌核抗逆性强,能在土壤中存活多年[19]。大丽轮枝菌基因组中还存在大量转座子以及频繁的基因重组现象,由此可产生大量的生理小种并快速适应不同宿主[20-23]。研究者们一直在寻找提升植物抗大丽轮枝菌能力的方法,并发现在番茄(*Solanum lycopersicum*)、海岛棉(*Gossypium barbadense*)、欧薄荷(*Mentha longifolia*)等植物中克隆的 *Ve1* 基因能提高植物对大丽轮枝菌的抗性[24-27]。最新的研究思路是基于宿主植物与大丽轮枝菌之间的 HIGS 效应,通过在植物中表达大丽轮枝菌致病或生长关键基因来提升植物对大丽轮枝菌的抗性[28-31]。然而,由于目标基因沉默发生在大丽轮枝菌中,因此很难利用基因表达量分析来迅速检测目标基因的沉默状态;研究者通常通过 Northern blot 技术筛选能产生大量目标基因的 siRNA 的植物,然后接种大丽轮枝

* **收稿日期**:2025-05-14　**修回日期**:2025-06-25　**网络出版时间**:2025-09-10T12:24
资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 32271898)
第一作者简介:邹润,女,研究方向为真菌分子生物学,E-mail:13658474511@163.com;**通信作者简介**:谢成建,男,教授,博士,E-mail:xcj614@163.com
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20250910.0938.004

菌,并进一步分析植物对大丽轮枝菌的抗性,但这样的实验过程限制了对大丽轮枝菌 HIGS 目标基因快速及大量的筛选[32]。为了解决在宿主植物中如何快速产生 siRNA 的问题,本研究构建了病毒载体,通过病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing,VIGS)技术在转基因本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)16c(后简称 16c-NB)中快速地形成针对大丽轮枝菌靶标基因的 siRNA。此外,已有研究表明可以通过构建串联基因片段 VIGS 载体实现 2 个基因的同时沉默[33-34]。因此,本研究通过 VIGS 技术在 16c-NB 中构建 *GFP* 基因的沉默表型并可通过荧光快速检测基因沉默情况;将大丽轮枝菌待沉默目标基因 *CYP51* 的部分片段与 *GFP* 基因片段进行串联,并将串联后的基因片段注射于 16c-NB 中,从而可通过荧光快速观察 *GFP* 基因的沉默情况来判断其中是否产生大丽轮枝菌目标基因的 siRNA。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将实验用 16c-NB 种子点种于腐殖土壤中萌发,萌发 10 d 后转植于加入少许蛭石的小花盆中,并在温度、空气相对湿度和光照时长分别设置为 25 ℃、60%和 12 h 的人工气候培养箱中培养,待植株生长 21 d 后用于基因沉默试验。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101(后简称农杆菌)、大丽轮枝菌 V991 以及大丽轮枝菌 *GFP* 表达菌株 VD-*GFP* 由本研究团队所在实验室保存。

1.2 载体构建与基因表达分析

使用引物 *GFP*-F 与 *GFP*-R 扩增 *GFP* 基因的部分片段,将它连接到 TRV2 载体,完成 TRV2:*GFP* 载体的构建;使用引物 *CYP51*-F 与 *CYP51*-R 扩增部分 *CYP51* 基因片段,将它插入到 TRV2:*GFP* 载体中,完成 TRV2:*GFP-CYP*51 载体的构建;使用宝生物工程(大连)有限公司出品的 RNAiso Plus 试剂盒提取 16c-NB 的总 RNA;cDNA 由宝生物工程(大连)有限公司出品的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成;通过 RT-PCR 分析沉默后基因的表达情况,以 *β-tublin* 基因和本氏烟草延伸因子基因 *NbEF1* 为基因表达量分析的内参。本研究所用引物的序列信息如表 1 所示。

表 1 研究中所用引物

Tab. 1 Primer sequences used in this research

基因名称	引物序列
GFP	F:GGggtaccCTTTTCACTGGAGTTGTCCC;R:CCGctcgagGCTTGTCGGCCATGATGTA
NbEF1	F:AGCTGACTGTGCTGTCCTGA;R:GGGGTGCATCTCAACAGATT
β-tublin	F:CCGTAACGGTCGCTACCTGA;R:AGCCTCCTCCTCGTACTCCT
CYP51	F:CCGgaattcAACGCCGAGGAGATCTACAG;R:CGGggtaccGGGACGTGTCGAACTTGTTG

注:引物中小写部分为酶切位点。

1.3 VIGS 操作程序

将 TRV1、TRV2、TRV2:*GFP* 或 TRV2:*GFP-CYP*51 载体转化的农杆菌在 LB 培养液(含 50 mg·L^{-1} 的卡拉霉素和 100 mg·L^{-1} 的利福平)于 28 ℃、200 r·min^{-1} 条件下振摇过夜培养,再按照 1∶25 的体积比将上述菌液稀释后接种到 LB 诱发培养基中(含 50 mg·L^{-1} 的卡拉霉素、100 mg·L^{-1} 的利福平和 200 μmol·L^{-1} 的乙酰丁香酮),在 28 ℃、200 r·min^{-1} 条件下振摇培养 24 h。将诱发后的菌液离心后重悬菌体于等体积的侵染培养基中(含 10 mmol·L^{-1} 的氯化镁和 10 mmol·L^{-1} 的 2-吗啉乙磺酸,pH 为 5.5),进一步离心后重悬菌体于半体积的侵染培养基中,调整菌悬液吸光度值为 0.3,并加乙酰丁香酮直到它的终浓度为 400 μmol·L^{-1};将 TRV1 载体转化的农杆菌分别与 TRV2、TRV2:*GFP* 或 TRV2:*GFP-CYP*51 载体转化的农杆菌按照 1∶1 的数量比混合后,用规格为 1 mL 的无针注射器将混合菌液注入 16c-NB 的叶片中,于培养室中培养 21 d 后分析 *GFP* 基因的沉默情况。

1.4 16c-NB 基因沉默效果的考察

在 VIGS 操作 10 d 后可以看到明显的基因沉默效果。在本研究中,通过观察在 TRV2:*NbPDS* 载体沉默 16c-NB 的八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase)基因 *NbPDS* 后植株叶片的白化现象来分析 VIGS 操作的

效果，此为阳性对照；而在 TRV2：*GFP* 载体沉默 16c-NB 的 *GFP* 基因后，通过蓝光电筒和荧光眼镜观察烟草的荧光来快速分析基因沉默的情况。

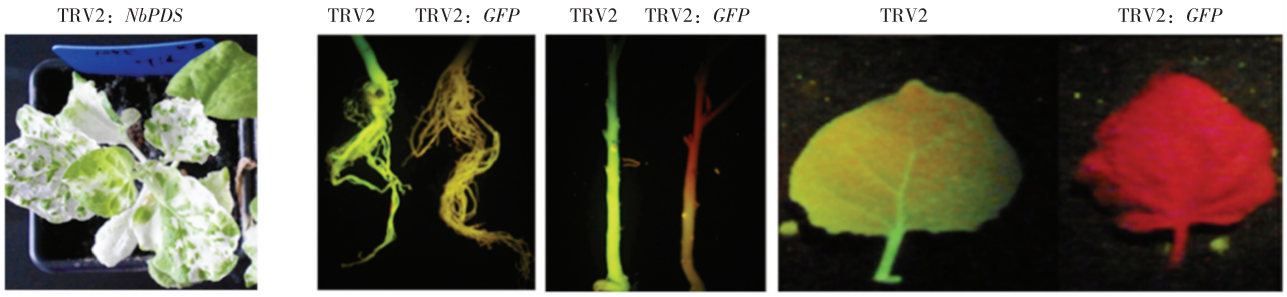
1.5　大丽轮枝菌的接种、致病性分析及 16c-NB 茎中大丽轮枝菌的分离

观察到 *GFP* 基因被沉默后，通过 16c-NB 根部接种大丽轮枝菌孢子悬浮液。在培养 20 d 后，受大丽轮枝菌侵染的 16c-NB 表现出典型的黄萎病症状，即植株萎蔫、叶片枯死和脱落。通过统计分析评估 16c-NB 的发病情况。此时，将 16c-NB 的茎截段后随用清水清洗 1 次，之后用体积分数为 75％的乙醇溶液清洗 2 min，再用质量分数为 1％的次氯酸溶液浸泡茎 5 min，最后用无菌水浸泡冲洗 3 次。将洗净的茎置于超净工作台上用无菌吸水纸上沥干，再用经灭菌处理的小刀去掉首尾后截成小段，放于铺有玻璃纸的 PDA 平板上，25 ℃培养 10 d。然后从茎段两端获得侵染烟草的大丽轮枝菌，且进而可用 1.2 节中的方法分析大丽轮枝菌 *GFP* 基因的表达情况。

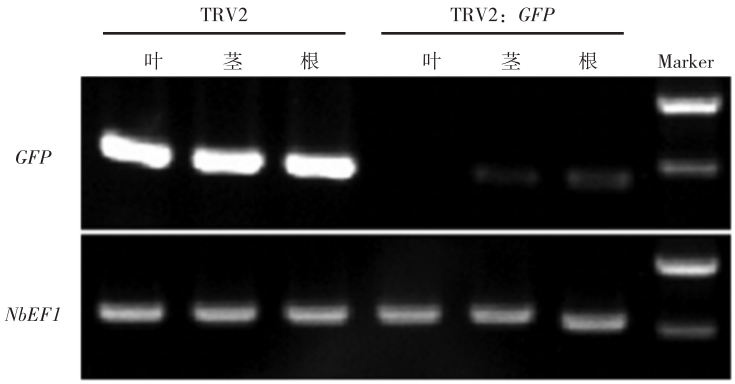
2　结果与分析

2.1　16c-NB 基因沉默情况分析

图 1a 显示，将经 TRV2：*NbPDS* 载体转入 16c-NB 后成功地沉默了 *NbPDS* 基因，16c-NB 叶片出现白化现象，表明本研究建立的 VIGS 实验体系能很好地工作。为了分析 TRV2：*GFP* 载体对 16c-NB 根、茎、叶中 *GFP* 基因的沉默情况，使用蓝光照射 16c-NB，其中 *GFP* 基因被沉默的植株在蓝光的激发下叶片呈现红色、根呈现黄色、茎部分呈现红色部分呈现黄色（图 1b）。为了更加准确地分析 16c-NB 的根、茎、叶 *GFP* 基因沉默的效果，分别提取三者的 RNA，经反转录后用 RT-PCR 分析了它们 *GFP* 基因的表达量，结果显示：与转入了 TRV2 载体的 16c-NB 相比，转入了 TRV2：*GFP* 载体的 16c-NB 叶片 *GFP* 基因被完全沉默，而根、茎中也仅有少量 *GFP* 基因表达（图 1c）。上述结果表明本研究采用的 TRV 基因沉默系统能很好地沉默 16c-NB 根、茎、叶中的 *GFP* 基因，可用于后续实验。



a　阳性对照　　b　16c-NB 根（左）、茎（中）、叶（右）中 *GFP* 基因沉默情况的荧光观察



c　RT-PCR 分析 16c-NB 中 *GFP* 基因的沉默情况

图 1　TRV 诱导的 VIGS 技术沉默 16c-NB *GFP* 基因的结果

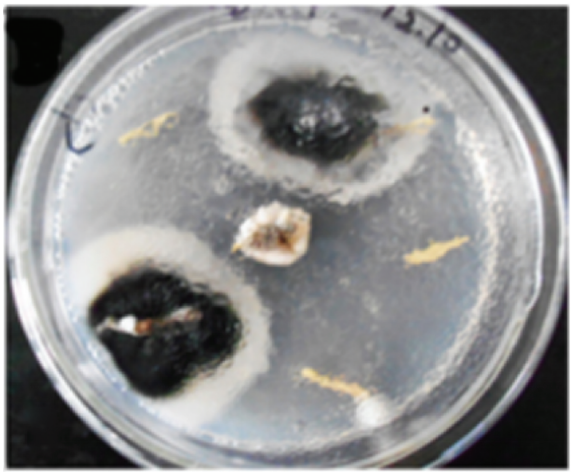
Fig. 1　Results of TRV-induced VIGS-mediated silencing of the 16c-NB *GFP* gene

2.2　大丽轮枝菌与 16c-NB 的 HIGS 效应

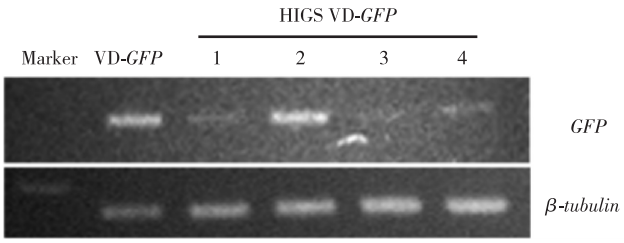
为了探究 16c-NB 产生的 sRNA 是否能通过跨界 RNA 干扰机制产生 HIGS 效应并影响大丽轮枝菌的致病

性,本研究在采用VIGS技术沉默了16c-NB中的*GFP*基因表达基础上,将带有*GFP*基因表达标签的大丽轮枝菌(后简称VD-*GFP*)接种到这些16c-NB上。经过15 d的培养,观察到接种了VD-*GFP*的16c-NB出现了典型的黄萎病萎蔫症状(图2a)。然后割取这些16c-NB茎段,经次氯酸灭菌后接种在铺有玻璃纸的PDA培养基上,待菌落少许长出茎段两端(图2b)。然后将菌落刮下并提取RNA,分析其中*GFP*基因的表达情况,发现多数VD-*GFP*的*GFP*基因表达量都有一定程度的降低(图2c)。结果表明16c-NB产生的siRNA通过RNA干扰机制,能够触发VD-*GFP*中的基因沉默效应。

a VD-*GFP*侵染注射TRV2:*GFP*载体后的16c-NB



b 从烟草茎段(图a中红色部分)分离出的VD-*GFP*



c 分离的VD-*GFP*中*GFP*基因表达情况

图2 大丽轮枝菌*GFP*基因沉默情况分析

Fig. 2 Analysis of *V. dahliae GFP* gene silencing

2.3 大丽轮枝菌*CYP51*基因沉默对16c-NB抗病能力的影响

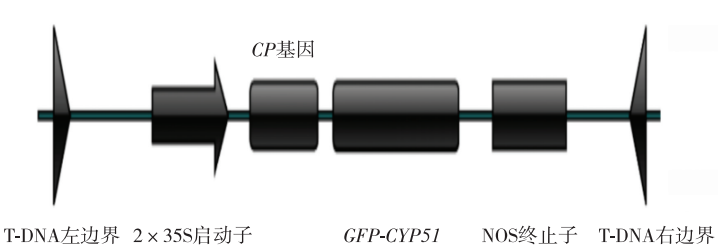
许多研究表明在植物中表达真菌致病或生长过程中关键基因的RNAi可提高植物对真菌的抗病能力[15-18],如在植物体内产生或者外源喷洒真菌*CYP51*基因的sRNA可提升植物抗真菌的能力[18,35]。本研究登录NCBI数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)并查询到大丽轮枝菌*CYP51*基因(NCBI登录号:XP_009649122)所编码的氨基酸序列,并与禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)*CYP51*基因所编码的氨基酸序列[18]进行比较,发现这2种真菌的*CYP51*基因高度同源(图3)。为分析大丽轮枝菌*CYP51*基因被沉默后是否提高了16c-NB的抗病能力,本研究将*CYP51*部分基因片段连接在TRV2:*GFP*载体的*GFP*基因片段之后,由此构建出TRV2:*GFP-CYP*51载体(图4a)。在注射TRV2:*GFP-CYP*51载体转化的农杆菌15 d后,通过蓝光电筒分析16c-NB叶片的*GFP*基因沉默情况(图4b),选择基因沉默效果较好的植株用于后续的大丽轮枝菌的接种实验。接种实验结果显示:作为对照的mock组(用无菌水代替2种载体转化的农杆菌进行注射)16c-NB无发病情况;与转入了TRV2:*GFP*载体的16c-NB相比,转入了TRV2:*GFP-CYP*51载体的16c-NB生长状况更好(图4c),说明它对大丽轮枝菌的抗性有所提高。由此可见,在宿主中建立的*CYP51*基因沉默信号提高了宿主的抗病能力。

```
                    *         20        *         40        *         60        *         80        *
VdCyp51     : MGLLQETTG-PAAQQFQ-TLGTASQVGVVVFGVVLLSVVLHVANQLLFKNPNEPPVVFSWFPFIGNIITYGMDPPAFFEANKKKYGDVFTFILLG :  93
EgCYP51A    : M---FHLL----------IYPLWVLVALFAVIIANI-LYQQLPR-----RPDEPPLVFHWFPFFGNAVAYGLDPCGFFEKCREKHGDVFTFIFG :  76
FgCYP51B    : MGLLQELAGHPLAQQFQ-ELPLGQQVGIGFAVFLVLSVVLNVLNQLLFRNPNEPPMVFHWFPFVGSTITYGMDPPTFFERENRAKHGDVFTFILLG :  94
FgCYP51C    : MESLYETL---------RTLPLSVSIPLTTSIIIILSIVTNVVKQLWFPNFHRPPVVFHIFPFIGSIVQYGIDPYAFFFDCRDKYGDCFTFILLG :  86

                  100       *       120       *       140       *       160       *       180       *
VdCyp51     : SKTTVAVGFQGNDFILNGKQRDVNAEEIYSVLTTPVFGRDVVYDCPNAKLMEQKKFMKIALTTEAFRSYVPIISHEVQNFFKTSKYFKEQSGVVN :  188
EgCYP51A    : RKIVACLGVDGNDFVLNSRLQDANAEEVYGPLTIPVFGSDVVYDCPNSKLMEQKKFVKFGLTQKALESHVQLIEREVLDYVETDPSFSGRTSTID :  171
FgCYP51B    : KKTTVAVGFAGNDFILNGKLKDVCAEEIYTVLTTPVFGKDVVYDCPNAKLMEQKKFMKIALTTEAFRSYVPIISSEVRDYFKRSPDFKGKSGIAD :  189
FgCYP51C    : KSTTVFLGFKGNDFILNGKHADLNAEDVYGKLTTPVFGEEVVYDCSNARFVDQKRLLKLGLTIDSLECYIPKFVKEVEDYVKNSPYFKGDTGIVN :  181

                        200       *       220       *       240       *       260       *       280
VdCyp51     : IPPRMAEITIFTASHALQGSEIRNKFDTSLAELYHDLDMGFSAINFALHWAPLPWNRKRDAAQKAVAQIFMDTIKDRRESGRTDG--LDMISHLM :  281
EgCYP51A    : VPKAMAEITIFTASRSLQGEEVRRKLTAEFAALYHDLDLGFRPVNFLFPWLPLPHNRKRDAAHIKVREVYMDIINDRRKGGIRTEDGTDMIANLM :  266
FgCYP51B    : IPKKMAEITIFTASHALQGSAIRSKFDESLAALYHDLDMGFTPINFMLHWAPLPWNRKRDHAQRTVAKIYMDTIKERRAKGNNESE-HDMMKHLM :  283
FgCYP51C    : ITEVMAEITIYTASGSLLGNEVRSMFDSTFATLYRHLDDGFQPINFVMPGLPLPQNFRRNHARKVVEKLFSDIISKRRETGNQGDE-TDMIWMLM :  275

                  *       300       *       320       *       340       *       360       *       380
VdCyp51     : RSTYKNGINVPDHEIAHMMIALLMAGQHSSSSTSSWIMARLAQNPSVIDDLYKEQVEALGADLP--PLTYEDISKLPLNQAIIKETLRLHAPIHS :  374
EgCYP51A    : GCTYKNGQPVPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSASSWIVLHLASSPDITEELYQEQLVNLSVNGALPPLQYSDLDKLPLLQNVVKETLRVHSSIHS :  361
FgCYP51B    : NSTYKNGIRVPDHEVAHMMIALLMAGQHSSSSTSSWIMLRLAQYPHIMEELYQEQVKNLGADLP--PLTYEDIAKLPLNQAIVKETLRLHAPIHS :  376
FgCYP51C    : NAQYKDGEPLPDHHAARMLIAILMGGQHNTAVSGAWLLLNLAHKPHLVQELYEEQTQVLGSPQE--PLTWENLQKLTLNGQVIKETLRLHSPIHS :  368

                  *       400       *       420       *       440       *       460       *
VdCyp51     : ILRKVKSPMEVPGTKYVVPTSHNLLSAPGTSATDPTYFPNPAIWDEYRWLPDSP--NAPTFSRAENADEEKIDYGYGLVSKGANSPYLPFGAGRH :  467
EgCYP51A    : ILRKVKRPMQVPNSPYTITTDKVIMASPTVIAMSEEYFENAKTWNPHRWDNRAK--E--------EVDTPDVIDYGYGAVSKGTKSPYLPFGAGRH :  447
FgCYP51B    : IMRAVKSPMEVPGTKYVIPTSHTLLAAPGVSATDSAFFPNPDEWDPHRWEADSP--NFPRMA-SKGEDEEKIDYGYGLVSKGSASPYLPFGAGRH :  468
FgCYP51C    : ILRQVKSPNRVPGTEWVVEPSHTLLSSPGTMARSEEFFPRPSEWDPHRWDKIEPLVK-------TAELGQTVDYGFGVMSKSVSSPYLPFGAGRH :  456

                  480       *       500       *       520       *
VdCyp51     : RCIGEQFANVQLQTITAEIVRLVKFSNADGSSNINGTDYASLFSRPLEPVNIRYERREKA- :  527
EgCYP51A    : RCIGEKFAYVNLGVIVATLVRNFRLSTIDGRPGVPETDYTSLFSRPAQPAEIRWERRKKI- :  507
FgCYP51B    : RCIGEHFANAQLQTIVAEVVREFKFRNVDGGHTLIDTDYASLFSRPLEPANIHWERRQ--- :  526
FgCYP51C    : RCVGENYAYAQLGAIVATFIRLVHIEQPDPKAPLPAPDYSSMFSRPMNPAEIRWRRRETVE :  517
```

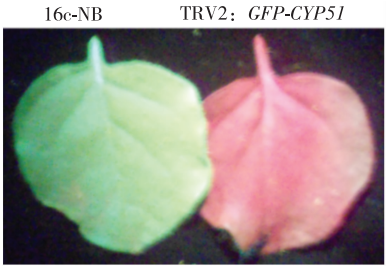
注：VdCyp51 为大丽轮枝菌 *CYP51* 基因编码的氨基酸序列，FgCYP51A、FgCYP51B、FgCYP51C 为谷禾镰刀菌 *CYP51* 基因编码的氨基酸序列。

图 3　大丽轮枝菌和禾谷镰刀菌 *CYP51* 基因编码的氨基酸序列比对分析

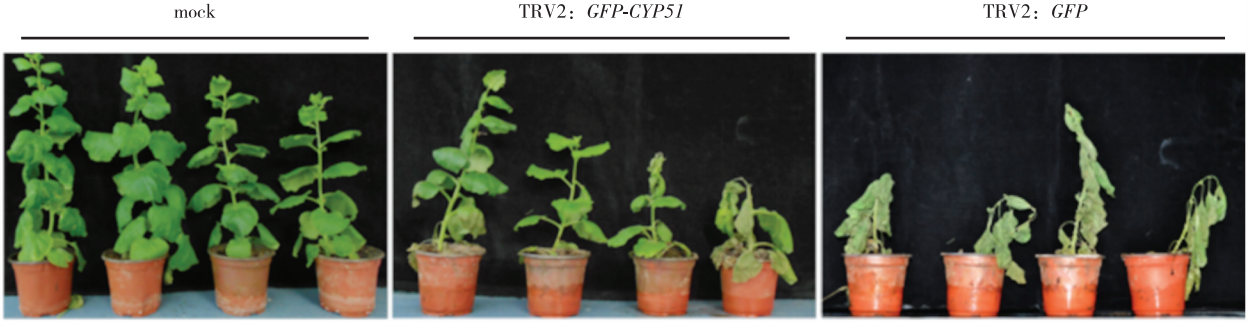
Fig. 3　Amino acid sequence alignment analysis on *CYP51* gene of *V. dahliae* and *F. graminearum*



a　TRV2：*GFP-CYP51* 载体结构简图



b　注射 TRV2：*GFP-CYP51* 载体后的 16c-NB 叶片荧光观察



c　接种大丽轮枝菌后的 16c-NB 发病情况

图 4　大丽轮枝菌 *CYP51* 基因的沉默提高了烟草的抗病能力

Fig. 4　Silencing of *CYP51* gene on tobacco enhance resistence against *V. dahliae*

3　讨论

采用宿主自我诱导与外源喷洒这 2 种递送策略，可赋予宿主植物针对病原真菌的 dsRNA。相关研究证实，

这2种策略均能明显降低禾谷镰刀菌对宿主植物的感染率[36]。大丽轮枝菌可给农作物造成严重病害,对它的防治有着极高的难度[19]。目前,许多叶面病原菌可通过外源喷洒dsRNA来防治,而大丽轮枝菌主要通过植物根部侵入植物体内,所以难以采用外源喷洒策略来进行防控。因此,在宿主植物中构建针对大丽轮枝菌基因的siRNA成为了对该病原真菌进行有效防控的重要策略。而精准选择合适的大丽轮枝菌目标基因以及适宜的沉默现象观察手段,对于该策略的有效应用显得至关重要[37]。研究表明,利用VIGS技术,能够在宿主植物体内迅速产生siRNA[33]。这些siRNA被大丽轮枝菌摄取后,进而激发了HIGS效应[28]。与传统抗性育种方法相比,HIGS技术优势明显:一方面它能减少对宿主植物基因代谢网络的干扰;另一方面则是所生成的siRNA在宿主植物体内不会产生外源蛋白,对于食用植物而言此特性尤为重要。此外,HIGS技术还能通过筛选针对多种病原真菌的目标基因来实现对这些病原真菌的防治,还能有效避免病原真菌在防治过程中产生耐受性[38]。已有研究表明,在植物中构建*CYP51*基因沉默效应,可以明显降低病原真菌的致病力[36,39]。基于同源比对,本研究精准锁定大丽轮枝菌的*CYP51*基因所编码的氨基酸序列,并对采用HIGS技术后宿主植物16c-NB对大丽轮枝菌的抗性提升效果予以评估;同时,为了能快速、直观地观察植物中基因沉默效应的发生情况,本研究巧妙地将*GFP*与*CYP51*这2个基因串联后进行沉默处理,借助16c-NB的荧光表现,可快速判断基因沉默是否发生。这不仅有利于快速筛选出更多大丽轮枝菌的目标基因,还能为针对该病原真菌的抗性育种工作提供极具价值的靶标。VIGS技术可以在植物中便捷且高效地形成大量siRNA,在时效性方面优于传统的转基因方法;并且多个VIGS载体可以同时注入宿主植物,由此实现对多个目标基因的同时沉默,有助于快速评估多个基因沉默对病原真菌的防控效果。然而需要指出的是,本研究所提出的方法目前暂时仅适用于抗大丽轮枝菌育种前期的筛选工作,还无法涉及其他阶段。

参考文献:

[1] WEIBERG A,BELLINGER M,JIN H L. Conversations between kingdoms:small RNAs[J]. Current Opinion in Biotechnology,2015,32:207-215.

[2] CHITWOOD D H,TIMMERMANS M C P. Small RNAs are on the move[J]. Nature,2010,467(7314):415-419.

[3] JIN W B,WU F L. Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves[J]. BMC Plant Biology,2015,15:1.

[4] KIM G,LEBLANC M L,WAFULA E K,et al. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts[J]. Science,2014,345(6198):808-811.

[5] ZHANG L,HOU D X,CHEN X,et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1:evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Research,2012,22(1):107-126.

[6] CHEN X,ZEN K,ZHANG C Y. Reply to Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice[J]. Nature Biotechnology,2013,31(11):967-969.

[7] DICKINSON B,ZHANG Y J,PETRICK J S,et al. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice[J]. Nature Biotechnology,2013,31(11):965-967.

[8] NOWARA D,GAY A,LACOMME C,et al. HIGS host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*[J]. The Plant Cell,2010,22(9):3130-3141.

[9] KOCH A,KOGEL K H. New wind in the sails:improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing[J]. Plant Biotechnology Journal,2014,12(7):821-831.

[10] ZHANG H,LI H C,MIAO X X. Feasibility,limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control[J]. Insect Science,2013,20(1):15-30.

[11] MAO Y B,XUE X Y,TAO X Y,et al. Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference[J]. Plant Molecular Biology,2013,83(1):119-129.

[12] LILLEY C J,DAVIES L J,URWIN P E. RNA interference in plant parasitic nematodes:a summary of the current status[J]. Parasitology,2012,139(5):630-640.

[13] YANG Y Z,JITTAYASOTHORN Y,CHRONIS D,et al. Molecular characteristics and efficacy of 16D10 siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots[J]. PLoS One,2013,8(7):e69463.

[14] PAPOLU P K,GANTASALA N P,KAMARAJU D,et al. Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides,

flp-14 and flp-18, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80603.

[15] NUNES C C, DEAN R A. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(5): 519-529.

[16] GHAG S B, SHEKHAWAT U K S, GANAPATHI T R. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(5): 541-553.

[17] GUO H Y, SONG X G, WANG G L, et al. Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97410.

[18] KOCH A, KUMAR N, WEBER L, et al. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14α-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(48): 19324-19329.

[19] FRADIN E F, THOMMA B P H J. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*[J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(2): 71-86.

[20] AMYOTTE S G, TAN X P, PENNERMAN K, et al. Transposable elements in phytopathogenic *Verticillium* spp. insights into genome evolution and inter- and intra-specific diversification[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 314.

[21] KLOSTERMAN S J, SUBBARAO K V, KANG S, et al. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(7): e1002137.

[22] KLOSTERMAN S, VERONESE P, DOBINSON K, et al. *Verticillium* comparative genomics: understanding pathogenicity and diversity[J]. Phytopathology, 2008, 98: S185.

[23] DE JONGE R, BOLTON M D, KOMBRINK A, et al. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen[J]. Genome Research, 2013, 23(8): 1271-1282.

[24] ZHANG Z, SONG Y, LIU C M, et al. Mutational analysis of the Ve1 immune receptor that mediates *Verticillium* resistance in tomato[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99511.

[25] 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*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51091.

[26] VINING K, DAVIS T. Isolation of a Ve homolog, mVe1, and its relationship to *Verticillium* wilt resistance in *Mentha longifolia* (L.) Huds[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 282(2): 173-184.

[27] FRADIN E F, ZHANG Z, JUAREZ AYALA J C, et al. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1[J]. Plant Physiology, 2009, 150(1): 320-332.

[28] SU X F, REHMAN L, GUO H M, et al. *AAC* as a potential target gene to control *Verticillium dahliae*[J]. Genes, 2017, 8(1): 25.

[29] SONG Y, THOMMA B P H J. Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(1): 77-89.

[30] ZHANG T, ZHAO Y L, ZHAO J H, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen[J]. Nature Plants, 2016, 2: 16153.

[31] ZHANG T, JIN Y, ZHAO J H, et al. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*[J]. Molecular Plant, 2016, 9(6): 939-942.

[32] QI T, ZHU X G, TAN C L, et al. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(3): 797-807.

[33] TURNAGE M A, MUANGSAN N, PEELE C G, et al. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2002, 30(1): 107-114.

[34] PEELE C, JORDAN C V, MUANGSAN N, et al. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors[J]. The Plant Journal, 2001, 27(4): 357-366.

[35] KOCH A, BIEDENKOPF D, FURCH A, et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(10): e1005901.

[36] KOCH A, HÖFLE L, WERNER B T, et al. SIGS vs HIGS a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(12): 1636-1644.

[37] SU X F, WANG Q, ZHANG T, et al. A *Verticillium dahliae* exoglucanase as potential HIGS target interacts with a cotton

cysteine protease to confer resistance to cotton *Verticillium* wilt[J]. Plant Biotechnology Journal,2024,22(8):2107-2109.

[38] KOCH A,WASSENEGGER M. Host-induced gene silencing-mechanisms and applications[J]. The New Phytologist,2021,231(1):54-59.

[39] HIGUERA-SOBRINO J J,BLANCO-PORTALES R,MOYANO E,et al. A HIGS approach targeting the *DCL1 CYP51* and *CHS* genes of the pathogen to control *Colletotrichum acutatum* infection of strawberry[J]. Acta Horticulturae. 2023,1381:149-156.

Synergistic VIGS-HIGS Silencing of *Verticillium dahliae CYP51* Gene Enhances Tobacco Disease Resistance

ZOU Run, XIE Chengjian

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Host-induced gene silencing (HIGS) has been extensively studied and applied in plant disease-resistant breeding in recent years; however, this technology first requires the establishment of small interfering RNAs (siRNA) targeting pathogen genes in host plants. Based on the concept that virus-induced gene silencing (VIGS) can rapidly generate siRNA in *Nicotiana benthamiana*, a fusion fragment capable of simultaneously silencing the *GFP* gene in transgenic *N. benthamiana* 16c (hereafter referred to as 16c-NB) and the *CYP51* gene in *Verticillium dahliae* was constructed. This fusion fragment was inserted into the VIGS vector TRV2, enabling rapid confirmation of whether gene silencing had occurred by observing the disappearance of green fluorescence in 16c-NB, while also inducing the production of large quantities of siRNA targeting the *V. dahliae CYP51* gene in 16c-NB. Results showed that the *GFP* gene in 16c-NB was silenced after transformation with the TRV2:*GFP-CYP51* vector. Moreover, the wilt symptoms of 16c-NB transformed with TRV2:*GFP-CYP51* were significantly less severe than those of control 16c-NB transformed with the TRV2:*GFP* vector after inoculation with *V. dahliae*. These findings indicated that siRNA targeting the *V. dahliae CYP51* gene, generated in 16c-NB via VIGS, significantly enhanced the resistance of this plant species to *V. dahliae*. The results suggest that the TRV2:*GFP*-target gene system established based on VIGS provides an efficient tool for the rapid screening of HIGS target genes conferring resistance to *V. dahliae*.

Keywords: host-induced gene silencing (HIGS); virus induced gene silencing (VIGS); *CYP51* gene; *Nicotiana benthamiana*; *Verticillium dahliae*

(责任编辑 方 兴)