

基于牡丹类黄酮糖基转移酶基因建立 VIGS 技术体系

舒庆艳^{1,*}, 朱瑾^{1,2,*}, 门思琦^{1,2}, 郝青³, 王倩玉^{1,2}, 刘政安¹, 曾秀丽⁴, 王亮生^{1,2,**}

(¹中国科学院北方资源植物重点实验室/中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093; ²中国科学院大学, 北京 100049; ³青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛 266109; ⁴西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 拉萨 850032)

摘要: 牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andrews) 花色的化学基础研究较为深入, 但因其无遗传转化体系, 导致花色相关基因的功能验证只能利用其他植物进行旁证。利用保守区段长分别为 413 和 418 bp 的牡丹花瓣类黄酮糖基转移酶基因 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT*, 通过 VIGS 表达载体, 采用二因素三水平的试验体系对目的基因进行沉默。结果表明, *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 的表达量在花斑中 (盛花期花瓣, 真空抽滤 15 min) 和非斑中 (蕾期花瓣, 真空抽滤 10 min) 分别比空载体处理的花斑中 (盛花期花瓣, 真空抽滤 10 min) 和非斑中 (蕾期花瓣, 真空抽滤 15 min) 降低了 65.0% 和 85.0%; 花斑中总花青苷含量分别降低了 24.2% 和 28.2%, 尤其是盛花期花瓣 (真空抽滤 15 min) 处理后 3G 型糖苷降低了 92.2%, 蕾期花瓣 (真空抽滤 10 min) 处理后 3G5G 型糖苷降低了 54.9%。由此获得了沉默 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 的适宜体系: 以盛花期或者花蕾期带花柄的花朵为材料, 抽真空渗透 10~15 min 后, 置于去离子水中暗培养 1 d (8 ℃, 湿度 60%); 之后转移至 23~25 ℃、湿度 60% 的环境, 光照培养 3 d 后可用于检测和分析。本研究建立的 VIGS 体系可有效沉默花瓣中的内源基因, 为牡丹基因功能验证及其花色形成的分子机制研究奠定了基础。

关键词: 牡丹; 花色; VIGS; 类黄酮糖基转移酶基因 (*UFGT*); 功能验证

中图分类号: S 685.11

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 01-0168-09

Establishing Virus Induced Gene Silencing (VIGS) System in Tree Peony Using *PsUFGT* Genes

SHU Qingyan^{1,*}, ZHU Jin^{1,2,*}, MEN Siqi^{1,2}, HAO Qing³, WANG Qianyu^{1,2}, LIU Zheng'an¹, ZENG Xiuli⁴, and WANG Liangsheng^{1,2,**}

(¹Key laboratory of Plant Resources and Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Landscape and Forestry College, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ⁴Institute of Vegetables, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandary Sciences, Lhasa 850032, China)

Abstract: Considerable progress has been made on the phytochemical basis of flower color formation

收稿日期: 2017-09-18; **修回日期:** 2018-01-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471909); 山东省高等学校科技计划 (J15LF01)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wanglsh@ibcas.ac.cn)

on tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews). However, due to lack of genetic transformation system, function of the genes related to flower color formation has to be characterized using other model plant systems. We utilized virus induced gene silencing (VIGS) for establishing the functional characterizing technique to study UDP-glucose: flavonoid glycosyltransferases (UFGTs) genes in tree peony. The fragments with 413 bp and 418 bp length with a putatively conserved domain of *PsUF3GT* and *PsUF5GT* were selected for constructing VIGS recombinant vectors, respectively. Nine treatments with two factors and three levels were conducted to test the gene silencing effects. The results showed that the expression level of *PsUF3GT* after infiltrating petals of blooming for 15 min, or the expression level of *PsUF5GT* after infiltrating petals of bud stage for 10 min, were reduced 65.0% and 85.0% as compared with that of control petals of blooming or bud stage infiltrated using empty vectors for 10 min or 15 min, respectively. Meanwhile, total anthocyanins content in petal blotch were also decreased 24.2% and 28.2% after treatment of flowers at blooming or bud stage by infiltration for 15 min or 10 min, respectively, in which, cyanidin 3-*O*-glucoside reduced 92.2% in petals at blooming stage infiltrated for 15 min and cyanidin 3,5-*O*-diglucoside reduced 54.9 % in petals at bud staged infiltrated for 10 min. Therefore, an optimal VIGS system has been established in tree peony, namely, flowers at blooming or bud stage were subjected to vacuum infiltration for 10 - 15 min, then kept in dark for 1 d at 8 °C with relative 60% humidity, afterwards, kept at 23 - 25 °C with normal light and relative 60% humidity for 3 d, then, treated samples could be used for further functional characterization of the silenced genes. Our VIGS method would be beneficial to functional characterization of the genes related to flower color formation, and study the molecular mechanism of flower color variation.

Keywords: tree peony; flower color; VIGS; flavonoid; UDP-glucose; flavonoid glycosyltransferases (UFGTs); functional characterization

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andrews) 花色形成的化学基础研究较为深入, 花瓣中含有 12 种花青苷, 其中天竺葵素 3 - 葡萄糖苷 (Pg3G)、天竺葵素 3,5 - 二葡萄糖苷 (Pg3G5G)、矢车菊素 3 - 葡萄糖苷 (Cy3G)、矢车菊素 3,5 - 二葡萄糖苷 (Cy3G5G)、芍药花素 3 - 葡萄糖苷 (Pn3G) 和芍药花素 3,5 - 二葡萄糖苷 (Pn3G5G) 是主要的花青苷 (Wang et al., 2001, 2004; 张晶晶 等, 2006; 李崇晖, 2010)。牡丹栽培品种, 尤其是西北牡丹品种群, 花瓣基部具有鲜艳硕大的色斑, 不仅增加了其观赏价值, 而且色斑常作为品种分类的重要依据之一。这些牡丹花瓣中色斑部分的花青苷主要由 Pn3G5G、Cy3G5G 和 Cy3G 组成, Pn3G 含量很低, 几乎不含 Pg 型色素, 推测花瓣基部 Cy 的糖苷化、甲基化和高花青苷含量是形成色斑的主要原因 (Wang et al., 2001, 2004)。Zhang 等 (2007) 分析了 35 个西北牡丹品种花瓣的花青苷组成, 斑中以 Cy3G 为主, 非斑以 Pn3G5G 为主, 斑中的花青苷含量明显高于非斑。

类黄酮是植物中一类重要的次生代谢产物, 通常需要在合成的最后一步进行糖苷化修饰, 以增加其在细胞内的稳定性、溶解性并影响花的显色 (田鹏和刘占林, 2011; 陈嘉景 等, 2016)。类黄酮糖苷化由糖基转移酶 (UDP-glucose: flavonoid glycosyltransferases, UFGTs) 完成, 其糖基供体通常是核苷酸糖 (nucleotide sugar, Uridine diphosphate, UDP), 如 UDP - 葡萄糖等。最早发现的是控制玉米粒色素的基因 *Bronze1*, 其编码类黄酮 UDP - 糖基转移酶 (Dooner & Nelson, 1997)。已经在很多植物中发现了类黄酮糖基转移酶基因, 如玉米、金鱼草、龙胆和牵牛等的 *UF3GT* (Schiefelbein

et al., 1985; Martin et al., 1991; Tanaka et al., 1996; Morita et al., 2015), 及龙胆和葡萄的 *UF5GT* 等 (Nakatsuka et al., 2008; Yang et al., 2014)。此外, 在月季中还有一种糖基转移酶先将花青苷 5-O-糖苷化后再继续将 3-O-修饰形成 3,5-双-O-糖苷, 聚类分析表明其与花青苷 3GT-和 5GT-糖基转移酶亚家族明显不同 (Ogata et al., 2005)。可见在不同物种中, 类黄酮糖苷化修饰基因存在多样性并由超家族基因组成。牡丹花瓣中类黄酮 (包括花青苷) 合成途径中部分相关酶基因已有克隆和表达分析 (周琳等, 2010, 2011; Du et al., 2015; Zhao et al., 2015), 而类黄酮糖基转移酶基因相关研究尚未见报道。

牡丹再生和遗传转化非常困难, 尚未见其遗传转化体系的报道, 利用转基因技术验证牡丹基因的功能, 存在技术瓶颈。而牡丹从实生苗到开花需要 3~4 年的时间, 开花相关的表型鉴定困难较大。病毒诱导的基因沉默 VIGS (Virus-induced gene silencing) 是近年来发现的一种转录后基因沉默现象, 可引起内源 mRNA 序列特异性降解 (Ratcliff et al., 2001)。VIGS 已作为一种高效的反向遗传学新技术应用于植物基因功能研究 (Purkayastha & Dasgupta, 2009), 包括蝴蝶兰 (Hsieh et al., 2013)、矮牵牛 (Broderick & Jones, 2014)、月季 (Lü et al., 2014) 和番茄 (季娜娜等, 2016) 等。从技术、材料自身角度考虑, 利用 VIGS 技术建立牡丹基因功能研究的技术体系, 可能是克服牡丹遗传转化困难瓶颈的手段。

利用同源克隆技术克隆了牡丹类黄酮糖基转移酶基因 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 的保守区段作为靶基因构建 TRV2 载体, 成功建立了 VIGS 沉默体系, 有效地降低了这两个基因的表达量和总花青苷含量。本研究结果对牡丹基因功能研究具有重要意义, 也为解析牡丹色斑形成的分子机制奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

紫斑牡丹‘青海湖银波’ (*Paeonia suffruticosa* ‘Qinghaihu Yinbo’) 栽植于中国科学院植物研究所牡丹芍药种质资源圃, 其斑为紫红色, 非斑为白色, 非斑部分未检测出花青苷, 斑部花青苷有 4 种: 矢车菊素 3-葡萄糖苷 (Cy3G)、矢车菊素 3,5-二葡萄糖苷 (Cy3G5G)、芍药花素 3-葡萄糖苷 (Pn3G) 和芍药花素 3,5-二葡萄糖苷 (Pn3G5G) (Zhang et al., 2007)。

VIGS 载体来自烟草脆裂病毒载体 (tobacco rattle virus, TRV), TRV1/TRV2 为中国农业大学观赏植物采后和逆境生理实验室马男教授馈赠, 载体信息参考 Tian 等 (2014) 的文献。所用标准品矢车菊素-3-葡萄糖苷 (Cy3G) 购自法国 Extrasynthese 公司 (Genay, France)。

1.2 基因克隆

花瓣总 RNA 的提取参照试剂盒说明书进行 [RNAPrep Pure Plant Kit, FastQuant cDNA 天根生化科技 (北京) 有限公司]。根据公共数据库中 3GT 和 5GT 序列设计上、下游引物克隆靶片段 (AQZ26785、ARA67360 和 AF171902)。用于 VIGS 沉默的 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 片段设计上、下游引物并添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。

扩增引物见表 1。

表 1 本研究所用引物序列相关信息
 Table 1 Primer lists and related information used in this study

用途 Purpose	编号 Code	引物序列 (5'-3') Primer sequence	长度/bp Length
qRT-PCR	3GT	F: TGGGGTTGCCTTTTATGGTCACTT; R: TCCACCTCCGATACTCTCTA	198
	5GT	F: TCGTTTGAAGCGTCTCTGTTTTAC; R: CCATTCCTTGCTTTCCAAATCTTC	169
内参 Reference	PsTub	F: GCACCAAAGAAGTGGACGAACAAAT; R: AGTAAACTGTTCACTCACACGCCTG	183
阳性克隆检测 PCR check for positive clone	TRV1	F: TTACAGGTTATTTGGGCTAG; R: CCGGGTTC AATTCCTTATC	646
	TRV2	F: TGGGAGATGATACGCTGTT; R: CCTAAA ACTTCAGACACG	280
载体构建 Vector construction	3GT-V	F: AAGGATCCCATGGCTCAATGACCAAAAGGCTAA; R: TTACTCGAGCATTCTTCGTAAATACT CCACCGTCG	413
	5GT-V	F: AAGGATCCCTTTGAAAAGCAAGGAATGGTGGTG; R: ACGCTCGAGTCACAAATCACCACC TTTCCCACC	418

注: 下划线表示碱基酶切位点。

Note: Underline indicated restriction enzyme cutting sites.

1.3 VIGS 体系建立

采用二因素三水平试验体系共设 9 个处理进行 VIGS 试验。花发育因素设盛花期 (斑色紫红, 非斑部分花瓣白色)、半开期 (斑色深紫红, 非斑部分花瓣白色)、蕾期 (斑浅红色, 非斑部分花瓣黄绿色) 3 个水平; 真空抽滤时间因素设 3 个水平分别为 10、15 和 20 min。

TRV2-3GT 和 *TRV2-5GT* 为目标基因, 相应的 *TRV2* 空载体为对照 (表 2)。转化方法参照 Tian 等 (2014) 的抽真空法, 重悬菌液的吸光值 $A_{600} = 1.0$, *pTRV2-3/5GT*、*pTRV1* 和 *pTRV2* 菌液的 A_{600} 值相同。将 *pTRV2-3/5GT* 和 *pTRV1*、*pTRV2* 和 *pTRV1* 菌液按体积比 1:1 分别混合, 暗处静置 4 h。

将牡丹花朵带 5 cm 花柄剪下, 分别置于 9 个处理的菌液中, 抽真空至 0.7 atm, 负压处理, 缓慢放气。每处理 3 朵花, 单花重复。将抽吸后的花瓣用去离子水漂洗, 去除多余菌液。花柄没于去离子水中, 8 °C, 湿度 60%, 暗培养 1 d; 之后转移至 23 ~ 25 °C, 相对湿度 60% 左右, 正常光照下培养 3 d。侵染 4 d 后采样, 将花瓣的斑部与非斑部分分开。选取花瓣作为 RNA 提取检测样本和色素抽提样本, RNA 检测样本置于液氮中速冻并存于 -80 °C, 色素抽提样本经冷冻干燥处理后保存于茶色干燥器中。之后检测目的基因的表达水平以及花青苷积累量相对于对照的变化。因非斑部分不积累花青苷, 所以侵染后仅测斑部花青苷成分及含量。

1.4 基因表达分析

基因表达分析参照 Du 等 (2015), 提取所有样品总 RNA, 并反转录成 cDNA, 作为荧光定量 PCR 的模板, 具体方法参照试剂盒说明进行 [FastQuant cDNA 和 SYBR Green, 天根生化科技 (北京) 有限公司]。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) 法计算实时荧光定量 PCR 试验中基因的相对表达量, 以 *PsTubulin* 作为内参基因 (Du et al., 2015)。将花瓣斑与非斑分开进行表达量分析, 分 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

1.5 斑部花青苷测定

将干燥后的花斑称重后提取花青苷 (Li et al., 2009)。采用 Dionex HPLC-DAD 分析系统, 色谱柱为 TSK gel ODS-80Ts QA, 4.6 mm (内径) × 150 mm (柱长) (日本 Tosoh 株式会社)。花青苷的定性和定量分析参照 Zhang 等 (2007) 和 Li 等 (2009) 的方法。利用 Agilent 1100 LC/MSD Trap

VL 液质联用仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 进行 HPLC 分析。标准品为矢车菊素 3 - O - 葡萄糖苷 (Cy3G), 通过半定量法计算花青苷含量 (Wang et al., 2001)。总花青苷含量 TA (mAU) = 0.0012[Cy3G ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)] + 0.0121, $R^2 = 0.994$, 花青苷含量以 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 干燥花瓣计。用 Chameleon 软件 (Ver. 6.60) 分析结果。

1.6 数据分析

荧光定量 PCR 和花青苷测定数据采用软件 SPSS 13.0 v (SPSS Inc., Chicago, IL) 进行显著性差异分析 ($P < 0.05$)。采用 Excel 2007 进行数据分析及绘制图表, 利用 DNAMAN5.0 及公共网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库等进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 靶片段的克隆和序列分析

根据上、下游引物扩增的 *PsUF3GT* 靶片段长度为 413 bp, 对推测编码的氨基酸序列进行 Blast P 分析, 与滇牡丹 (*P. delavayi*) 同源序列花青苷 3 - O - 糖基转移酶 PdA3GT_AQZ26785 和 PsUF3GT_ARA67360) 相似性为 94%和 89%、与葡萄 (*Vitis vinifera*, VvUF3GT_BAB41024) 和忍冬 (*Lonicera japonica*, LjA3GT_ALL32290) 同源序列相似性分别为 69%和 66%。利用在线网络软件 (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>) 分析, 其属于 Glycosyltransferase_GTB_type 超家族, 含有 PSPG 基序 (plant secondary product glycosyltransferase box, 图 1)。

WLNDQKAESV AYISFGTAAT PPPTEILAIA EALEASGVAF LWSLKDHLNV HLPKGFLDKT RACGMVVPWA
PQLQILAHGA VGVFITHCGW NSVLESIGGG VPMICRPFFG DQKLNACMVE DVWEIGVKID GGVFTKN

图 1 *PsUF3GT* 靶片段核苷酸推测编码的氨基酸序列

下划线表示 PSPG 基序。

Fig. 1 The deduced amino acid sequences of the target fragment of *PsUF3GT*

Underline indicated plant secondary product glycosyltransferase box (PSPG-box) .

克隆的 *PsUF5GT* 靶片段长度为 418 bp, 与芍药 (*Paeonia lactiflora*, 黄酮醇 5 - O - 糖基转移酶, PIF5GT_AF171902) 和滇牡丹 (*P. delavayi*, PdF5GT_ARA67364) 同源序列相似性分别为 99%和 71%, 与矮牵牛 (*Petunia × hybrida*, 花青苷 5 - O - 糖基转移酶, PhA5GT_BAA89009) 同源序列相似性为 73%。利用在线网络软件 (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>) 分析, 其属于 Glycosyl-transferase_GTB_type 超家族, 其氨基酸在 337 ~ 380 处有 UDPG (UDP-glycosyltransferases) 特征序列 (图 2)。

LEKQGMVVPW CNQLEVL~~LSHK~~ SVGCF~~L~~THCG WNSSLES~~L~~VLC GVPV~~V~~AF~~P~~QW ADQAT~~N~~AKLI EDV~~W~~K~~T~~G~~V~~RM
VV~~N~~EDG~~V~~VEG CEIK~~R~~C~~L~~EMV MGG~~G~~ERGEEM RR~~N~~VE~~K~~W~~K~~EL AREAV~~K~~D~~G~~ES SDK~~N~~L~~K~~AF~~V~~N EV~~G~~K~~G~~G~~D~~L *

图 2 *PsUF5GT* 靶片段推测编码的氨基酸序列

下划线表示 UDPG 特征序列。

Fig. 2 The deduced amino acid sequences of the target fragment of *PsUF5GT*

Underline indicated UDPG characteristic sequence.

2.2 VIGS 沉默 *UFGTs* 体系建立

2.2.1 花瓣中沉默 *PsUF3GT* 后的表达量

利用所扩增保守区片段长分别为 413 和 418 bp 的 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 基因片段构建 TRV2 载体, 用于沉默目的基因。通过二因素三水平 9 个试验处理, 寻找 *UFGT* 基因沉默的最佳处理条件, 对沉默后的基因表达量进行分析 (表 2)。

通过对不同处理花瓣的斑与非斑中 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 基因表达量分析发现, 9 个处理中, 盛开期花瓣经过真空抽滤 15 min (处理 2) 沉默 *PsUF3GT* 基因, 其表达量在斑中降低最多, 比对照空载体盛开期花瓣真空抽滤 10 min (处理 1)、半开期花瓣真空抽滤 20 min (处理 6) 和蕾期花瓣真空抽滤 15 min (处理 8), 分别降低了 65.0%、45.0% 和 71.0%, 但在非斑中表达量没有显著降低。蕾期花瓣真空抽滤 10 min 沉默 *PsUF5GT* 后 (处理 7), 其在非斑中的表达量降低最多, 比处理 8 降低了 85.0% (表 2)。因此, *PsUF3GT* 的最佳沉默处理条件是将盛开期的花真空抽滤 15 min; 而 *PsUF5GT* 的最佳沉默处理条件是将蕾期的花真空抽滤 10 min。

表 2 不同处理沉默 *PsUF3GT* 后牡丹花瓣中的表达量

Table 2 Relative expression levels of petals after silencing *PsUF3GT* by VIGS treatment

发育时期 Stage	抽滤时间/min Infiltration	处理 Treatment	靶基因 Target gene	<i>PsUF3GT</i> 表达量		<i>PsUF5GT</i> 表达量	
				斑 Blotch	非斑 Non-blotch	斑 Blotch	非斑 Non-blotch
盛开期 Blooming	10	1	<i>TRV2</i>	1.00 ± 0.07 cd	1.00 ± 0.10 cd	1.00 ± 0.01 b	1.01 ± 0.16 b
	15	2	<i>TRV2-3GT</i>	0.35 ± 0.06 f	1.23 ± 0.23 c	1.00 ± 0.13 b	0.91 ± 0.07 bc
	20	3	<i>TRV2-5GT</i>	1.32 ± 0.04 b	3.24 ± 0.27 a	1.41 ± 0.12 a	1.10 ± 0.12 b
半开期 Semi-blooming	10	4	<i>TRV2-3GT</i>	1.76 ± 0.15 a	1.48 ± 0.10 bc	0.29 ± 0.01 d	0.51 ± 0.05 bc
	15	5	<i>TRV2-5GT</i>	0.79 ± 0.09 de	1.99 ± 0.33 b	0.54 ± 0.05 c	1.20 ± 0.05 b
	20	6	<i>TRV2</i>	0.64 ± 0.03 e	1.02 ± 0.09 cd	0.24 ± 0.02 d	0.21 ± 0.02 c
蕾期 Bud	10	7	<i>TRV2-5GT</i>	1.69 ± 0.11 a	2.72 ± 0.20 a	0.72 ± 0.05 c	0.85 ± 0.08 bc
	15	8	<i>TRV2</i>	1.21 ± 0.11 bc	0.43 ± 0.23 d	0.17 ± 0.03 d	5.67 ± 0.37 a
	20	9	<i>TRV2-3GT</i>	1.10 ± 0.12 bc	0.91 ± 0.17 cd	0.35 ± 0.01 d	1.00 ± 0.59 b

2.2.2 沉默 *PsUF3GT* 后的花斑中花青苷的含量

对 9 个处理花斑中花青苷组分和含量进行了测定 (表 3), 检测结果与基因荧光定量结果基本一致。即: 盛开期花瓣真空抽滤 15 min (处理 2) 和半开期花瓣真空抽滤处理 10min (处理 4) 后, 沉默 *PsUF3GT* 的花斑中检测出的 4 种花青苷总含量比对照空载体、真空抽滤处理 10 min 后的盛开期花斑中总花青苷含量 (处理 1) 降低了 24.2%, 其中降低最多的是 Pn3G 为 20.0%, 其次是 Cy3G、

表 3 不同处理沉默 *PsUF3GT* 后牡丹花斑中花青苷成分和含量

Table 3 Anthocyanin component and content of petal blotch after silencing *PsUF3GT* by VIGS treatment

发育时期 Stage	抽滤时间/min Infiltration	处理 Treatment	靶基因 Target gene	花青苷成分和含量/(mg · g ⁻¹)			
				Cy3G5G	Cy3G	Pn3G5G	Pn3G
盛开期 Blooming	10	1	<i>TRV2</i>	0.26 ± 0.02 a	0.92 ± 0.04 a	0.93 ± 0.04 a	13.68 ± 0.31 a
	15	2	<i>TRV2-3GT</i>	0.18 ± 0.06 ab	0.56 ± 0.28 abc	0.71 ± 0.15 ab	10.52 ± 2.36 ab
	20	3	<i>TRV2-5GT</i>	0.16 ± 0.01 bc	0.63 ± 0.01 ab	0.68 ± 0.03 abc	10.04 ± 0.37 b
半开期 Semi-blooming	10	4	<i>TRV2-3GT</i>	0.05 ± 0.01 d	0.46 ± 0.02 bc	0.79 ± 0.11 ab	4.92 ± 0.18 cd
	15	5	<i>TRV2-5GT</i>	0.08 ± 0 cd	0.38 ± 0.02 bc	0.59 ± 0.08 bcd	5.91 ± 0.84 c
	20	6	<i>TRV2</i>	0.02 ± 0 d	0.34 ± 0.02 bc	0.54 ± 0.04 bcd	1.88 ± 0.06 d
蕾期 Bud	10	7	<i>TRV2-5GT</i>	0.02 ± 0 d	0.17 ± 0.01 c	0.28 ± 0.01 d	1.53 ± 0 d
	15	8	<i>TRV2</i>	0.03 ± 0.01 d	0.25 ± 0.07 bc	0.37 ± 0.08 cd	1.90 ± 0.44 d
	20	9	<i>TRV2-3GT</i>	0.03 ± 0 d	0.39 ± 0.06 bc	0.63 ± 0.09 abc	2.82 ± 0.37 cd

Pn3G5G、Cy3G5G, 分别为 2.3%、1.4%和 0.1%; 3G 型糖苷降低了 92.2%, 3G5G 型降低了 7.8%。利用蕾期花瓣真空抽滤 10 min 沉默 *PsUF5GT* (处理 7), 其斑中检测出的 4 种花青苷总含量比对照空载体真空抽滤 15 min 的蕾期花斑 (处理 8) 中降低了 28.2%, 其中降低最多的是 Pn3G 为 12.5%, 其次是 Pn3G5G、Cy3G5G、Cy3G 分别降低了 9.3%、6.1%和 0.01%; 其中 3G5G 型糖苷比对照 (处理 8) 降低了 54.9%, 而 3G 型糖苷降低了 45.1%。

3 讨论

影响 VIGS 沉默效果的因素很多。首先是沉默基因片段长度和位置的选择, 前人研究结果表明 300 ~ 500 bp 插入片段的沉默效果最佳 (Thomas et al., 2001; Lu et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004), 本研究中利用扩增保守区段长度在 400 ~ 450 bp 的片段来沉默同源家族基因, 取得了较好的沉默效果。如针对某一特异基因进行沉默时, 则需考虑序列的特异性, 可以通过沉默非翻译区或者特异区段的办法, 确保沉默特异目标基因 (杨迎伍 等, 2007)。采用烟草脆裂病毒 TRV 为载体, 其能有效地将目标基因在生长点或分生组织中沉默, 并获得系统的沉默效果 (Liu et al., 2002b)。已有研究表明 TRV 在番茄和烟草中应用时, 采用真空渗透和高压喷射幼叶均能获得较好的侵染效果 (Liu et al., 2002a)。本研究中借鉴了月季中 VIGS 技术的关键要点 (Tian et al., 2014), 采用抽真空渗透法侵染花瓣, 获得了较好的侵染效果。此外, 利用 TRV 沉默基因后的植物材料对温度比较敏感, 侵染番茄时最佳沉默表型在 22 °C 或者更低的温度, 而侵染烟草最佳温度为 25 °C 左右 (Liu et al., 2002a; Burch-Smith et al., 2004), 低温和低湿条件有助于增强基因沉默的强度和延长沉默持续的时间 (Fu et al., 2006)。本研究在光照培养箱控温 (25 °C) 控湿 (相对湿度 60%) 的条件下进行, 获得了较好的试验结果。因此, 成功沉默基因需要严格掌控好每个技术环节。

针对牡丹遗传转化困难、无法验证基因功能等问题, 采用二因素三水平共 9 个试验处理, 利用 VIGS 技术成功沉默了 *PsUF3GT* 和 *PsUF5GT* 基因。建立了沉默 *PsUF5GTs* 的 VIGS 体系, 即用 *PsUF5GTs* 基因保守区段为靶片段, 以盛开期或者蕾期带花柄的花朵为材料, 抽真空渗透 10 ~ 15 min 后, 置于去离子水中, 暗培养 1 d (8 °C, 湿度 60%); 之后转移至 23 ~ 25 °C、湿度 60% 的环境, 正常光照培养 3 d 后进行检测和分析。研究结果为验证牡丹 *UF5GTs* 基因的功能奠定了基础, 也为验证牡丹中其他重要功能基因提供了研究思路和技术依据。尽管 VIGS 技术已经广泛应用于多种植物中 (季娜娜 等, 2016), 但在牡丹中的成功应用尚属首例, 这为牡丹的功能基因挖掘提供了技术保障。

References

- Broderick S R, Jones M L. 2014. An optimized protocol to increase virus-induced gene silencing efficiency and minimize viral symptoms in *Petunia*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 219 - 233.
- Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, Dinesh-Kumar S P. 2004. Application and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal*, 39: 734 - 746.
- Chen Jia-jing, Peng Zhao-xin, Shi Mei-yan, Xu Juan. 2016. Advances in on flavonoid composition and metabolism in *Citrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43: 384 - 400. (in Chinese)
- 陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 徐娟. 2016. 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展. *园艺学报*, 43: 384 - 400.
- Dooner H K, Nelson O E. 1997. Controlling element-induced alterations in UDP glucose flavonoid glucosyltransferase, the enzyme specified by the bronze locus in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5623 - 5627.

- Du H, Wu J, Ji K X, Zeng Q Y, Bhuiyad M W, Su S, Shu Q Y, Ren H X, Liu Z A, Wang L S. 2015. Methylation mediated by an anthocyanin O-methyltransferase, is involved in purple flower coloration in *Paeonia*. *Journal of Experimental Botany*, 66: 6563 - 6577.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Zhang H X, Xie Y H, Jiang W B, Zhao X D, Luo Y B. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecular Cell*, 1: 153 - 160.
- Hsieh M H, Pan Z J, Lai P H, Lu H C, Yeh H H, Hsu C C, Wu M H, Chung M C, Wang S S, Chen W H, Chen H H. 2013. Virus-induced gene silencing unravels multiple transcription factors involved in floral growth and development in *Phalaenopsis* orchids. *Journal of Experimental Botany*, 64: 3869 - 3884.
- Ji Na-na, Min De-dong, Shao Shu-jun, Li Fu-jun, Zhang Xin-hua. 2016. Progress of research on application of VIGS vectors in vegetables. *Plant Physiology Journal*, 52: 810 - 816. (in Chinese)
- 季娜娜, 闵德栋, 邵淑君, 李富军, 张新华. 2016. VIGS 载体在蔬菜作物中的应用研究进展. *植物生理学报*, 52: 810 - 816.
- Li Chong-hui. 2010. The flavonoid composition in tree peony petals and their effects on the coloration [Ph. D. Dissertation]. Beijing: The Chinese Academy of Sciences. (in Chinese)
- 李崇晖. 2010. 牡丹花瓣类黄酮成分分析及其对花色的影响 [博士论文]. 北京: 中国科学院植物研究所.
- Li C H, Du H, Wang L S, Shu Q Y, Zheng Y R, Xu Y J, Zhang J J, Zhang J, Yang R Z, Ge Y X. 2009. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* Section *Moutan*) Yellow Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8496 - 8503.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. 2002a. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, 31: 777 - 786.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar S P. 2002b. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIMI* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30: 415 - 429.
- Lü P T, Zhang C Q, Liu J T, Liu X W, Jiang G M, Jiang X Q, Khan M A, Wang L S, Hong B, Gao J P. 2014. RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (*Rosa hybrida*) petal senescence. *Plant Journal*, 78: 578 - 590.
- Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30: 296 - 303.
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant Journal*, 1: 37 - 49.
- Morita Y, Kanako Ishiguro K, Tanaka Y, Iida S, Hoshino A. 2015. Spontaneous mutations of the UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene confers pale- and dull-colored flowers in the Japanese and common morning glories. *Planta*, 242: 575 - 587.
- Nakatsuka T, Sato K, Takahashi H, Yamamura S, Nishihara M. 2008. Cloning and characterization of the UDP glucose: anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene from blue-flowered gentian. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1241 - 1252.
- Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, Tsugawa H, Suzuki M. 2005. Plant biochemistry: anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature*, 435: 757 - 758.
- Purkayastha A, Dasgupta I. 2009. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 967 - 976.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, 25: 237 - 245.
- Schiefelbein J W, Raboy V, Fedoroff N V, Nelson Jr O E. 1985. Deletions within a defective suppressor-mutator element in maize affect the frequency and developmental timing of its excision from the bronze locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 4783 - 4787.
- Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Fujiwara H, Ashikari T, Kusumi T. 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiology*, 37: 711 - 716.
- Tian J, Pei H X, Zhang S, Chen J W, Chen W, Yang R Y, Meng Y L, You J, Gao J P, Ma N. 2014. TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *Journal of Experimental Botany*, 65: 311 - 322.
- Tian Peng, Liu Zhan-lin. 2011. Glycosyltransferase supergene family. *Chemistry of Life*, 31: 732 - 736. (in Chinese)
- 田 鹏, 刘占林. 2011. 糖基转移酶超家族. 2011. 生命的化学, 31: 732 - 736. (in Chinese)
- Thomas C L, Jones L, Baulcombe D C, Maule A J. 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana bethamiana* using a potato virus X vector. *Plant J*, 25: 417 - 425.

- Wang L S, Hashimoto F, Shiraishi A, Aoki N, Li J J, Sakata Y. 2004. Chemical taxonomy of the Xibei tree peony from China by floral pigmentation. *Journal of Plant Research*, 117: 47 - 55.
- Wang L S, Shiraishi A, Hashimoto F, Aoki N, Shimizu K, Sakata Y. 2001. Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars. *Journal of Plant Research*, 114: 33 - 43.
- Yang Y Z, Labate J A, Liang Z C, Cousins P, Prins B, Preece J E, Aradhya M, Zhong G Y. 2014. Multiple loss-of-function 5-*O*-glucosyltransferase alleles revealed in *Vitis vinifera*, but not in other *Vitis* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 2433 - 2451.
- Yang Ying-wu, Li Zheng-guo, Song Hong-li, Yang Ping. 2007. Application of VIGS in plant gene function study. *Plant Physiology Communications*, 43: 379 - 383. (in Chinese)
- 杨迎伍, 李正国, 宋红丽, 杨平. 2007. VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用. *植物生理学通讯*, 43: 379 - 383.
- Zhang Jing-jing, Wang Liang-sheng, Liu Zheng-an, Li Chong-hui. 2006. Recent advances in flower color research of tree peony. *Acta Horticulturae Sinica*, 33: 1383 - 1388. (in Chinese)
- 张晶晶, 王亮生, 刘政安, 李崇晖. 2006. 牡丹花色研究进展. *园艺学报*, 33: 1383 - 1388.
- Zhang J J, Wang L S, Shu Q Y, Liu Z A, Li C H, Zhang J, Wei X L, Tian D K. 2007. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Scientia Horticulturae-Amsterdam*, 114: 104 - 111.
- Zhao D Q, Tang W H, Hao Z J, Tao J. 2015. Identification of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in two coloured tree peony flowers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459: 450 - 456.
- Zhou Lin, Wang Yan, Peng Zhen-hua. 2010. Isolation and tissue-specific expression of chalcone synthase gene *Ps-CHS1* in tree peony. *Acta Horticulturae Sinica*, 37: 1295 - 1302. (in Chinese)
- 周琳, 王雁, 彭镇华. 2010. 牡丹查耳酮合酶基因 *Ps-CHS1* 的克隆及组织特异性表达. *园艺学报*, 37: 1295 - 1302.
- Zhou Lin, Wang Yan, Ren Lei, Peng Zhen-hua. 2011. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *PsDFR1* from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Plant Physiology Journal*, 47: 885 - 892. (in Chinese)
- 周琳, 王雁, 任磊, 彭镇华. 2011. 牡丹二氢黄酮醇 4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析. *植物生理学报*, 47: 885 - 892.

征稿

《Horticultural Plant Journal》 (《园艺学报》英文版) 征稿

《园艺学报》英文版《Horticultural Plant Journal》由中国科学技术协会主管，中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办，于 2015 年 7 月创刊，国内统一连续出版物编号 CN10-1305/S，国际标准连续出版物编号 ISSN 2095-9885，Online ISSN 2468-0141，双月刊，大 16 开，与国际出版商 Elsevier 合作，在 ScienceDirect 网络出版平台实现全文开放存取 (<http://www.sciencedirect.com/journal/horticultural-plant-journal>)。

办刊宗旨：准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展，反映学科研究水平和发展动向，为学术交流服务，为促进学科发展作贡献。

刊载范围：有关园艺作物种质资源、遗传育种、栽培技术、生理生化、生态、基因组学、生物技术、植物保护、采后处理与利用等原创性研究论文、研究简报及综述等。

欢迎投稿：投稿网址 <https://www.journals.elsevier.com/horticultural-plant-journal/>。邮寄地址：北京中关村南大街 12 号，中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部（邮编 100081）。联系电话：010-62124615。