



刘晓宇,张欣,彭悦,等. FabHLH37 调控草莓抗灰霉病的功能分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):213-221.

LIU Xiaoyu,ZHANG Xin,PENG Yue, et al. Function analysis of FabHLH37 regulating strawberry resistance to *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(2):213-221.

FabHLH37 调控草莓抗灰霉病的功能分析

刘晓宇,张欣,彭悦,于淼,熊劲松*,程宗明

(南京农业大学园艺学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本文旨在通过验证草莓 bHLH(basic/helix-loop-helix)家族转录因子 FabHLH37 的功能,解析其调控草莓抗灰霉病的机制,为草莓的抗病育种提供新的基因资源。[方法]以栽培草莓品种‘红颜’为试验材料,提取灰霉菌感染后的草莓果实总 RNA 并反转录为 cDNA,克隆 *FabHLH37* 编码区序列,并使用在线软件对其进行生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR(qPCR)分别检测该基因在草莓不同组织及果实接种灰霉菌后的相对表达量;利用烟草瞬时表达系统研究该基因的亚细胞定位;通过草莓果实瞬时表达系统研究 *FabHLH37* 抗灰霉病功能。[结果]*FabHLH37* 基因 CDS 全长 789 bp,编码 262 个氨基酸,理论等电点(pI)为 6.61,相对分子质量为 2.9×10^5 。进化分析显示 *FabHLH37* 与月季、苹果等蔷薇科植物 bHLH37 蛋白同源关系较近。亚细胞定位分析显示 *FabHLH37* 特异性定位于细胞核。qPCR 分析表明 *FabHLH37* 在草莓根中表达量最高,叶次之,灰霉菌感染可以显著诱导 *FabHLH37* 基因的表达。草莓果实瞬时表达结果显示,与对照相比,过表达 *FabHLH37* 的草莓果实接种灰霉菌后感病程度轻,而沉默 *FabHLH37* 的草莓果实相反。进一步的 qPCR 检测发现,在草莓果实瞬时表达体系中,*FaPRI/4/5-1*、*FaBG2-1*、*FaCHI3-1*、*FaSOD*、*FaPAL* 等多个防御基因的表达量与 *FabHLH37* 的表达量呈正相关,即过量表达 *FabHLH37* 可显著提高这些基因的表达量,而沉默 *FabHLH37* 则显著降低这些基因的表达量。[结论]*FabHLH37* 可通过诱导防御基因的表达从而正向调控草莓灰霉病。

关键词:草莓;灰霉病;bHLH 转录因子 bHLH37;防御基因

中图分类号:S668.4

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)02-0213-09

Function analysis of FabHLH37 regulating strawberry resistance to *Botrytis cinerea*

LIU Xiaoyu,ZHANG Xin,PENG Yue,YU Miao,XIONG Jinsong*,CHENG Zongming

(College of Horticulture,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]This paper aimed to verify the function of strawberry bHLH(basic/helix-loop-helix)family transcription factor FabHLH37,and analyze the mechanism of its regulation of strawberry resistance to gray mold,so as to provide new gene resources for strawberry disease resistance breeding.[Methods]The total RNA of strawberry ‘Benihoppe’was extracted and reversely transcribed into cDNA.The *FabHLH37* coding region sequence was cloned and bioinformatic analysis was performed using online software.Real-time quantitative PCR(qPCR)was used to detect the relative expression of this gene in different tissues of strawberry and in fruits inoculated with *Botrytis cinerea*.The subcellular localization of the gene was studied using the transient expression system of tobacco.The function of *FabHLH37* against *Botrytis cinerea* was studied by transient expression system in strawberry fruits.[Results]The total length of *FabHLH37* gene CDS was 789 bp,encoding 262 amino acids.The theoretical isoelectric point(pI)was 6.61,and the relative molecular weight was 2.9×10^5 .Analysis of homologous evolution with different species of bHLH37 protein showed that FabHLH37 protein was closely related to the bHLH37 protein in Rosaceae crops such as rose and apple.The subcellular localization results showed that FabHLH37 was specifically expressed in the nucleus.The qPCR analysis showed that the expression of *FabHLH37* was the highest in strawberry roots,followed by leaves,and the expression of *FabHLH37* gene was significantly induced by *Botrytis cinerea* infection.The transient expression of *FabHLH37* in strawberry fruits showed that compared with the control,strawberry fruits with overexpression of *FabHLH37* were less susceptible to *Botrytis cinerea* inoculation,while strawberry fruits with silence of *FabHLH37* were the opposite.Further qPCR detection showed that the expression levels of *FaPRI/4/5-1*、*FaBG2-1*、*FaCHI3-1*、*FaSOD*、*FaPAL* and other defense genes were positively correlated with the expression levels of *FabHLH37* in the transient expression system of strawberry fruits.Overexpression of *FabHLH37* could significantly increase the expression of these genes,while silencing *FabHLH37*

收稿日期:2023-03-08

基金项目:江苏省政策引导类计划(苏北科技专项)项目(SZ-LYG202104);江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者:熊劲松,副教授,主要从事草莓抗病生物学研究,E-mail:jsxiong@njau.edu.cn。

could significantly decrease the expression of these genes. [Conclusions] FabHLH37 transcription factor could positively regulate resistance to *Botrytis cinerea* by inducing the expression of defense genes in strawberry fruits.

Keywords: strawberry; *Botrytis cinerea*; bHLH transcription factor bHLH37; defense genes

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 属于蔷薇科草莓属多年生草本植物, 因其果实风味鲜美、营养丰富而深受大众青睐^[1-3]。目前, 我国草莓以设施栽培为主, 由于栽培环境的特殊性, 草莓在生长发育过程中容易受到各种病害的侵害, 其中灰霉病是主要病害之一^[4]。感染灰霉病会导致草莓花干枯、果实腐烂, 造成重大的经济损失^[5-7]。目前在草莓生产中, 传统灰霉病防治方式的防治时间长、易污染环境、防治效果不理想等问题突出^[8-9]。而挖掘草莓抗病基因, 研究其抗病机制, 并以此为基础培育抗灰霉病的草莓品种是解决以上问题的有效途径之一。

当灰霉菌侵染植物时, 病原微生物信号分子或病原微生物降解宿主细胞的代谢产物, 即 P/DAMP (pathogen/damage-associated molecular patterns) 被植物模式识别受体 PRR (pattern recognition receptors) 特异性识别并结合后激活了 PTI (P/DAMP triggered immunity), 然后通过信号通路传递病原信号, 进一步诱导防卫基因的表达, 使植物产生防御反应^[10-12]。在此过程中, 转录因子作为基因表达的关键调控子起着至关重要的作用, 这些转录因子主要属于 NAC、bZIP、WRKY、ERF、MYB 和 bHLH 等基因家族^[13]。

bHLH (basic/helix-loop-helix) 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 在植物生长发育、次生代谢产物合成以及抗逆性等方面发挥重要作用^[14]。陈亚铎等^[15]发现草莓 bHLH 转录因子 FaFIT 能调控植物对铁元素的吸收, 异源过表达 *FaFIT* 的拟南芥株系根系吸收 Fe^{2+} 能力显著增强。Schaart 等^[16]发现草莓 FabHLH3 在调控草莓果实原花青素的合成中起重要作用, 而森林草莓 FvbHLH9 则被发现能正调控花青素的合成^[17]。此外, 森林草莓 bHLH 转录因子 FvICE1 可正调控植株的抗旱性和抗寒性^[18], 而在响应生物胁迫方面, Cheng 等^[19]研究表明大豆 bHLH 转录因子 GmPIBI 可增强大豆对疫霉菌的抗性。白杨 *PdlbHLH1* 通过调控类黄酮的合成从而增强其对灰霉病的抗性^[20]。然而有关草莓 bHLH 转录因子在抗病方面的研究尚未见报道。

本课题组前期对灰霉菌侵染后草莓果实进行转录组测序分析, 发现 *FabHLH37* 在灰霉菌侵染后表达量显著上升^[21], 推测该基因可能在防御草莓灰霉病过程中发挥作用。因此, 本研究通过生物信息学分析、亚细胞定位、qPCR 以及草莓果实瞬时表达等试验, 探究草莓 bHLH 转录因子 *FabHLH37* 调控草莓抗灰霉病的功能, 旨在为草莓抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为栽培草莓品种‘红颜’。试验所用烟草为本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 和带核定位信号的红色荧光蛋白转基因烟草 (mRFP-NLS)。烟草种植在营养土、蛭石和珍珠岩 (体积比为 5:5:1) 混合的栽培基质, 置于 23 °C 植物培养室中生长 (光照/黑暗时间为 16 h/8 h)。灰霉菌菌株 B05.10 由华中农业大学李国庆教授惠赠, 植物瞬时转化所用农杆菌菌株 GV3101 保存于本实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成 取 50 mg 灰霉菌侵染的草莓果实, 经液氮速冻后研磨, 使用 Plant Total RNA Isolation Kit Plus (for gene) 试剂盒提取 RNA, 再利用琼脂糖凝胶电泳和核酸仪检测 RNA 质量和浓度, 最后使用 PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) 试剂盒反转录成 cDNA。

1.2.2 *FabHLH37* 基因克隆 根据转录组分析的基因名称 (maker-Fvb3-4-augustus-gene-121.26-mRNA-1) 在蔷薇科植物基因组数据库 (<http://www.rosaceae.org>) 中检索 *FabHLH37* 的序列, 根据其 CDS 序列设计引物并合成, 引物序列见表 1。以草莓果实 cDNA 为模板, 用 PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶扩增获得基因全长。

1.2.3 *FabHLH37* 的生物信息学分析 使用 GSDS 2.0 在线工具 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 对 *FabHLH37* 基因结构进行分析; 使用 ExPASy ProtParam tool 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 *FabHLH37* 蛋白相对分子质量、等电点、亲水性和不稳定指数等理化性质进行分析。使用 SOPMA 在线网站 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测该蛋白二级结构。使用

NCBI 的 BLASTp 工具 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 筛选出 26 条 FabHLH37 蛋白同源序列,用 MEGA X 软件构建系统发育树,采用邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 进行 1 000 次引导复制。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因 Gene	上游引物 Forward primers(5'→3')	下游引物 Reverse primers(5'→3')	用途 Usage
<i>FabHLH37</i> -OE	AAAGGATCCATGCAGCCGAAAAACCAAG	AAAGTCGACGACGAGTAACGTTGGATCTAAAAC	克隆 Cloning
<i>FabHLH37</i>	GCTGTTAGCAAAGGTGGTCC	TCATCCTCACTGGAGCAAAGT	RT-qPCR
<i>FaActin</i>	CCCAAGTAAGGATGCCCCCATGTTGG	TTGGCAAGGGGAGCAAGACAGTTGGTAG	内参基因 Reference gene
<i>FabHLH37</i> -RNAi-f	TTCCCATGGCAGCCGAAAAACCAAGAACT	GGGCCATTTAAATCCCAGACGCCTCCAGATTAT	克隆 Cloning
<i>FabHLH37</i> -RNAi-r	CGGGATCCCCAGACGCCTCCAGATTAT	TCCCCGGGCAGCCGAAAAACCAAGAACT	克隆 Cloning
<i>FaPR1</i>	CTAAATATCTTCTCCTGCCATA	AATGTTGTATCTATTGCTGTT	RT-qPCR
<i>FaPR4</i>	TCGTGTTCTTGGTGATGTTGTG	TGCGGGTTGTAGAGGTGGT	RT-qPCR
<i>FaPR5-1</i>	TGGCAGCAAACCAATCAAG	CCATACGGTGTAGGGGCAGT	RT-qPCR
<i>FaPR10</i>	TTCCCTCCTTCGTTTTCTC	TTCGAACACCACCATCTCCT	RT-qPCR
<i>FaMYC2</i>	CTCTCCGAGCTGTTGTTCCA	TCTGACTCCGTCGTTGCAG	RT-qPCR
<i>FaJAZ1</i>	AACCTCGTCGACATGCAGTT	ATTTGAAGCCTCTGGGAGCC	RT-qPCR
<i>FaJAZ2</i>	AGACATGCAACCTCCTCAGC	GATCTCCTTGGCCTTCTCCG	RT-qPCR
<i>FaPDF</i>	GCTTCTGAAGAGACGCTGATTCGACGT	ATGGCTTGAAGCACATGCATTTTC	RT-qPCR
<i>FaPDF1.2</i>	GGATGCCGACTTGTTCAAAAA	CGGGTATTGCCACAATTGC	RT-qPCR
<i>FaLOX</i>	ATCTGAAGGTGAGTGAGAGC	GTGCCAAGAACATCATCTA	RT-qPCR
<i>FaAOS</i>	CAGAACCCTCTCCTATCTCG	GATTGTGACACGCTTCGTC	RT-qPCR
<i>FaOPR2</i>	GGAGCCGTTATTTCTGTCAGC	TCAAAACCTGCTCGAATGGC	RT-qPCR
<i>FaSOD</i>	ATGGTCTCCTGAAG ATGA	TAGAGTGTGTCCTCAGTGAG	RT-qPCR
<i>FaPAL</i>	CTTCTGTGGTGCTGTTTGATG	AGGGTGGTGCTTCAGTTTATGT	RT-qPCR
<i>FaCHI3-1</i>	AGCTCTTCTTAGGACTCCCTG	CTTGGACCAAAGCATGACACCGCC	RT-qPCR
<i>FaBG2-1</i>	CTAAATATCTTCTCCTGCCATA	AATGTTGTATCTATTGCTGTTG	RT-qPCR
<i>FaWRKY1</i>	TGTGCAGGGTGTGCTCTCTT	TGGGATTTGGATTGCCTTTTAC	RT-qPCR
<i>FaWRKY11</i>	TATTCAGCTCCTCCACCTCCTCC	CCGGGGCCGGGGCTACGGCAGCT	RT-qPCR
<i>FaWRKY25</i>	CGGATCATTCTTCGGCTCT	CCCTCCTCCTGACTTGGCTTCT	RT-qPCR

注:1)加粗序列为酶切位点。The bold sequence is the enzyme digestion site. 2) *FaPR*:病程相关蛋白基因 Pathogenesis-related protein gene; *FaMYC*:髓细胞组织增生蛋白基因 Myelocytomatosis protein gene; *FaJAZ*:茉莉酸 ZIM 结构域蛋白基因 Asmonate ZIM-domain protein gene; *FaPDF*:植物防御基因 Plant defensin gene; *FaLOX*:脂氧合酶基因 Lipoxygenase gene; *FaAOS*:丙二烯氧化物合酶基因 Allene oxide cyclase gene; *FaOPR*:12-氧代植二烯酸还原酶基因 12-oxophytodieneoate reductase gene; *FaSOD*:超氧化物歧化酶基因 Superoxide dismutase gene; *FaPAL*:苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia lyase gene; *FaCHI*:几丁质酶基因 Chitinases gene; *FaBG*: β -1,3-半乳糖葡聚糖酶基因 β -1,3-glucanase gene; *FaWRKY*:WRKY 转录因子基因 WRKY transcription factor gene. 下同 The same as follows.

1.2.4 FabHLH37 的亚细胞定位 用 SnapGene 软件设计包含相关酶切位点的目的基因引物(表 1),以草莓果实 cDNA 为模板,扩增得到带有酶切位点的目的片段。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 对基因片段和 pJX003 载体进行酶切,胶回收后通过 T4 DNA 连接酶连接,构建带绿色荧光蛋白 (GFP) 标签的过表达载体:pJX003-*FabHLH37*-GFP。将成功构建的载体转入农杆菌菌株 GV3101,用 YEP 液体培养基(含 Kan 50 mg·mL⁻¹, Rif 20 mg·mL⁻¹)培养菌液至 D_{600} 为 0.8~1.0,离心并收集菌体,用悬浮液[含 10 mmol·L⁻¹ MES(pH5.8), 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 100 μ mol·L⁻¹ AS]重悬菌体至 D_{600} 约为 0.8,重悬好的菌液于黑暗条件下静置 3 h。选取适龄生长期的带核定位信号烟草,用 1 mL 注射器(去针头)将农杆菌菌液从背面注入烟草叶片。注射完的烟草暗培养过夜,正常培养 2~3 d 后,用剪刀剪取 1 cm² 的叶片制片,通过激光共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.2.5 草莓瞬时表达验证 FabHLH37 的功能 *FabHLH37* 沉默载体构建:选取 *FabHLH37* 基因的特异序列,用 Primer 5.0 软件设计相应的基因沉默引物(表 1),利用该引物以 pJX003-*FabHLH37* 质粒为模板扩增得到正、反向干扰小片段条带。将正、反小片段按先后顺序连接到 pFGC5941 载体中,成功构建的 pFGC5941-*FabHLH37* 质粒转入农杆菌菌株 GV3101。草莓瞬时表达验证功能:准备好生长状态一致、果形端正且处于大绿果期的‘红颜’草莓果实,用 5% 的次氯酸钠溶液浸泡 3 min,再用无菌水清洗 2 次,在超净工作台中吹干表面水分后备用。过表达菌液 pJX003-*FabHLH37* 和对照空载 pJX003 以及基因沉默菌液 pFGC594-*FabHLH37* 和空载 pFGC5941 的培养,收集重悬步骤同 1.2.4 节。4 种菌液重悬完成后于 28 $^{\circ}$ C、100 r·min⁻¹ 继续培养 1 h。利用 2.5 mL 注射器分别将相应的菌液从果柄中心处垂直注射于果实,直至整

个果实呈现透明水渍状。注射好的果实置于温度 23 ℃、湿度 70% 的培养箱中暗培养 1 d, 然后在光照度 4 000 lx、光照/黑暗时间为 16 h/8 h 的环境中正常培养。在培养至第 5 天时, 收集灰霉菌孢子至浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹, 每个果实接种 5 μL 菌液, 隔天拍照观察草莓果实病害情况。拍照完成后, 每个处理取 6 个果实, 保存于 -80 ℃ 备用。使用 Image J 软件统计接种灰霉菌第 3 天(注射农杆菌第 7 天)的病斑面积, 试验进行 3 次生物学重复。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 设计 *FabHLH37* 的特异性定量引物, 以草莓不同组织的 cDNA 为模板进行 qPCR, 以 *FaActin* 为内参基因, 分析 *FabHLH37* 的组织特异性。以不同侵染时间草莓果实的 cDNA 为模板进行 qPCR, 分析灰霉菌侵染后 *FabHLH37* 的表达情况。草莓果实注射完成后, 以注射农杆菌第 5 天的草莓果实 cDNA 为模板, 检测该基因和相关抗病基因的表达情况。引物序列见表 1。

1.3 数据分析

采用 Excel 2016 软件整理数据; 采用 IBM SPSS Statistics 24 软件进行差异分析; 采用 Origin 2023 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 草莓 *FabHLH37* 基因的克隆及生物信息学分析

以栽培草莓‘红颜’的 cDNA 为模板, 克隆得到 *FabHLH37*, 基因全长为 789 bp, 共编码 262 个氨基酸(图 1)。GSDB 在线分析显示, *FabHLH37* 有 2 个外显子, 1 个内含子。进一步用 SMART 分析其结构域, 显示该蛋白属于 bHLH 转录因子家族成员, 在第 92~141 位氨基酸有保守的 HLH 结构域。使用 ExPASy ProParam tool 对其氨基酸的性质进行分析, 结果显示 *FabHLH37* 的相对分子质量为 2.9×10^5 , 等电点为 6.61, 亲水性指数 -0.499, 为亲水性蛋白; 不稳定系数为 66.49, 表明该蛋白的稳定性较低。用 SOPMA 网站预测 *FabHLH37* 蛋白二级结构, 结果表明其蛋白主要由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β -转角构成, 所占比例分别为

43.51%、42.75%、9.92% 和 3.82%。草莓 *FabHLH37* 与其他 25 个物种同源蛋白进化分析结果(图 2)表明, *FabHLH37* 与森林草莓、月季和苹果中 bHLH37 蛋白的亲缘关系较近, 而与水稻和玉米的亲缘关系较远。

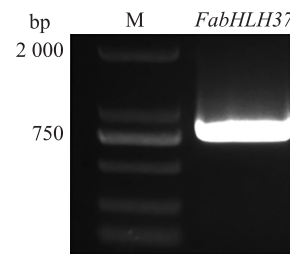


图 1 草莓 *FabHLH37* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of the *FabHLH37* gene in strawberry
M. DNA marker(DL2000).

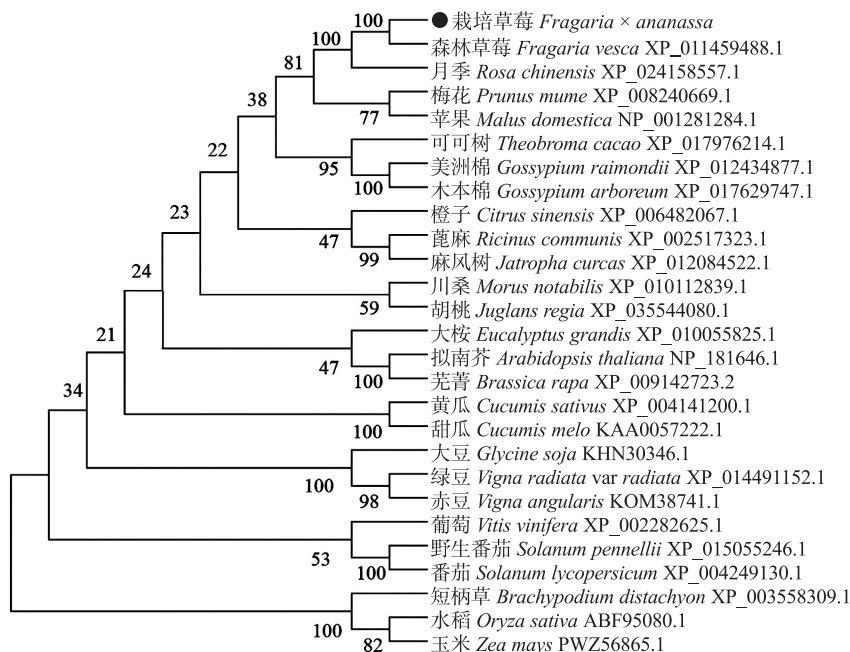


图 2 *FabHLH37* 与不同植物 bHLH37 蛋白的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *FabHLH37* with other bHLH37 proteins from different plant species

2.2 FabHLH37 的亚细胞定位

由图 3 可见:35S::GFP-*FabHLH37* 的烟草样品 GFP 信号与带核定位信号肽的红色荧光信号(mRFP-NLS)完全重合,表明 *FabHLH37* 定位在细胞核。

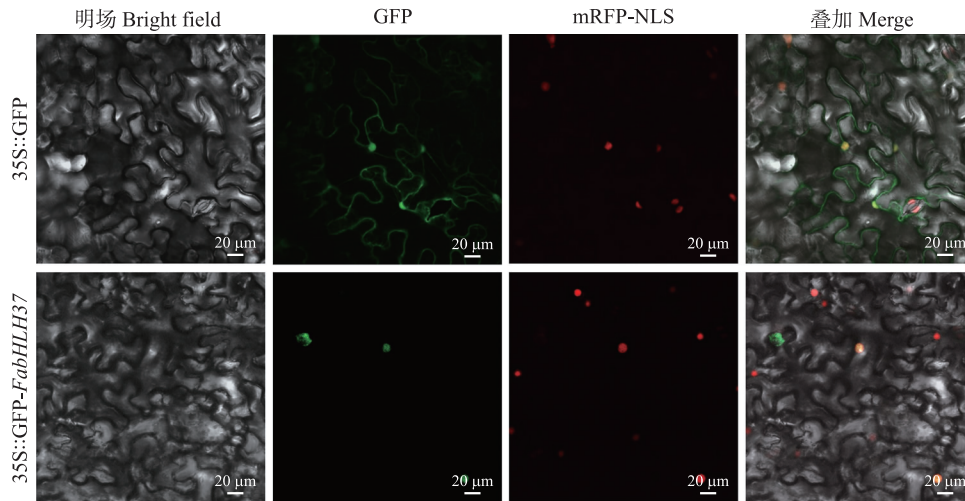


图 3 *FabHLH37* 在本氏烟草叶片中的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *FabHLH37* protein in *Nicotiana benthamiana* leaves

GFP:绿色荧光蛋白 Green fluorescent protein; mRFP-NLS:带核定位信号肽的红色荧光蛋白 Nuclear localization signal tagged monomeric red fluorescent protein.

2.3 FabHLH37 组织特异性分析和灰霉菌侵染后的表达模式分析

如图 4-A 所示:*FabHLH37* 在不同组织中的表达量有较大的差异。其中 *FabHLH37* 在根中表达量最高,约为叶柄表达量的 5 倍,而在成熟果实中的表达量最低。由图 4-B 可见:清水处理的对照组 *FabHLH37* 表达量除 12 h 短暂上升后基本保持不变。接种灰霉菌的试验组 *FabHLH37* 表达量发生了显著变化:0~72 h,*FabHLH37* 表达量持续上升并在 72 h 达到峰值,是对照的 4.3 倍,之后在 96 h 时表达量又下降。表明灰霉菌处理能诱导 *FabHLH37* 的表达。

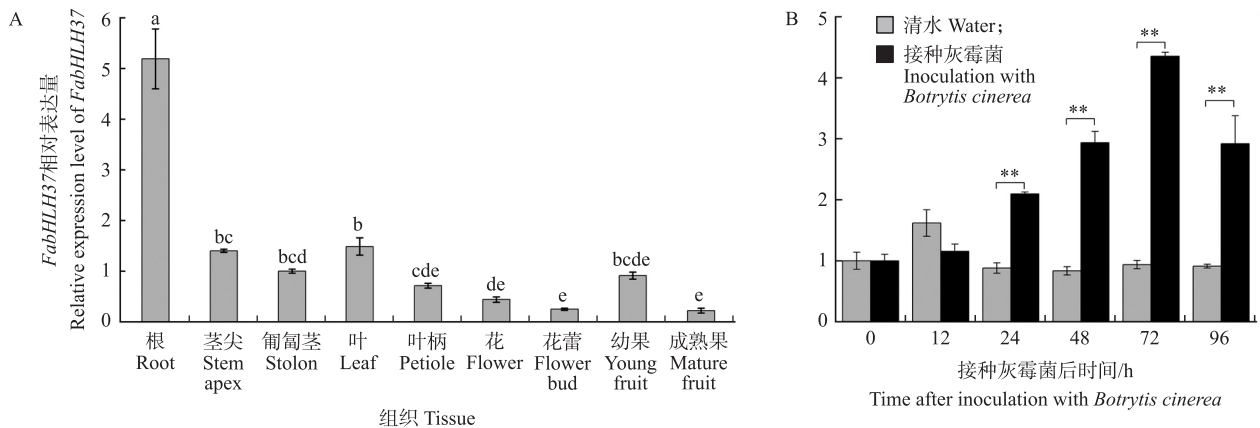


图 4 草莓 *FabHLH37* 的组织表达量 (A) 及灰霉菌诱导表达量 (B)

Fig. 4 The expression levels of *FabHLH37* in different strawberry plant tissues (A) and after *Botrytis cinerea* inoculation (B)

不同小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 下同。

The different lower letters mean significant difference ($P < 0.01$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same as follows.

2.4 FabHLH37 调控草莓果实灰霉病抗性的分析

草莓果实中瞬时过表达和沉默 *FabHLH37* 后,接种灰霉菌孢子,通过检测对照组和试验组 *FabHLH37* 基因的表达量,测量果实表面的病斑面积和发病率,分析 *FabHLH37* 能否参与调控草莓果实对灰霉病的抗性。在瞬时表达第 5 天 (DAI5) 时,每种处理取 1/3 的果实用于 RT-qPCR 检测,验证草莓果实瞬时表达体系的可靠性。由图 5-A 可见:过表达 *FabHLH37* (*FabHLH37*-OE) 的果实基因表达量为对照组的 4.1 倍,而

RNA 干扰沉默 *FabHLH37* (*FabHLH37*-RNAi) 果实基因表达量下调了 43%, 说明 *FabHLH37* 成功在草莓果实中瞬时表达。因此, 对余下的草莓果实进行灰霉菌接种处理, 进行下一步的功能研究。由图 5-B 可以看出: 接种灰霉菌第 3 天 (DABI3), 草莓果实开始出现感病症状, 接种部位逐渐褐化、坏死, 表面出现灰霉菌菌丝并向外蔓延; 接种灰霉菌第 5 天 (DABI5), *FabHLH37*-OE 果实病斑面积明显小于对照组果实, 而 *FabHLH37*-RNAi 的果实灰霉菌菌丝的覆盖面积显著大于对照组果实。统计接种灰霉菌第 3 天的果实病斑面积中发现, 与对照组相比, *FabHLH37*-OE 的果实病斑面积显著减少 64.1 mm^2 , *FabHLH37*-RNAi 果实病斑面积显著增加 61.6 mm^2 (图 5-C)。同时瞬时表达的果实发病率在接种灰霉菌第 3 天差异显著, 与对照相比, *FabHLH37*-OE 的果实发病率下降了 28.9%, 而 *FabHLH37*-RNAi 的果实比对照高 13.3% (图 5-D)。以上结果表明 *FabHLH37* 正调控草莓果实对灰霉菌的抗性。

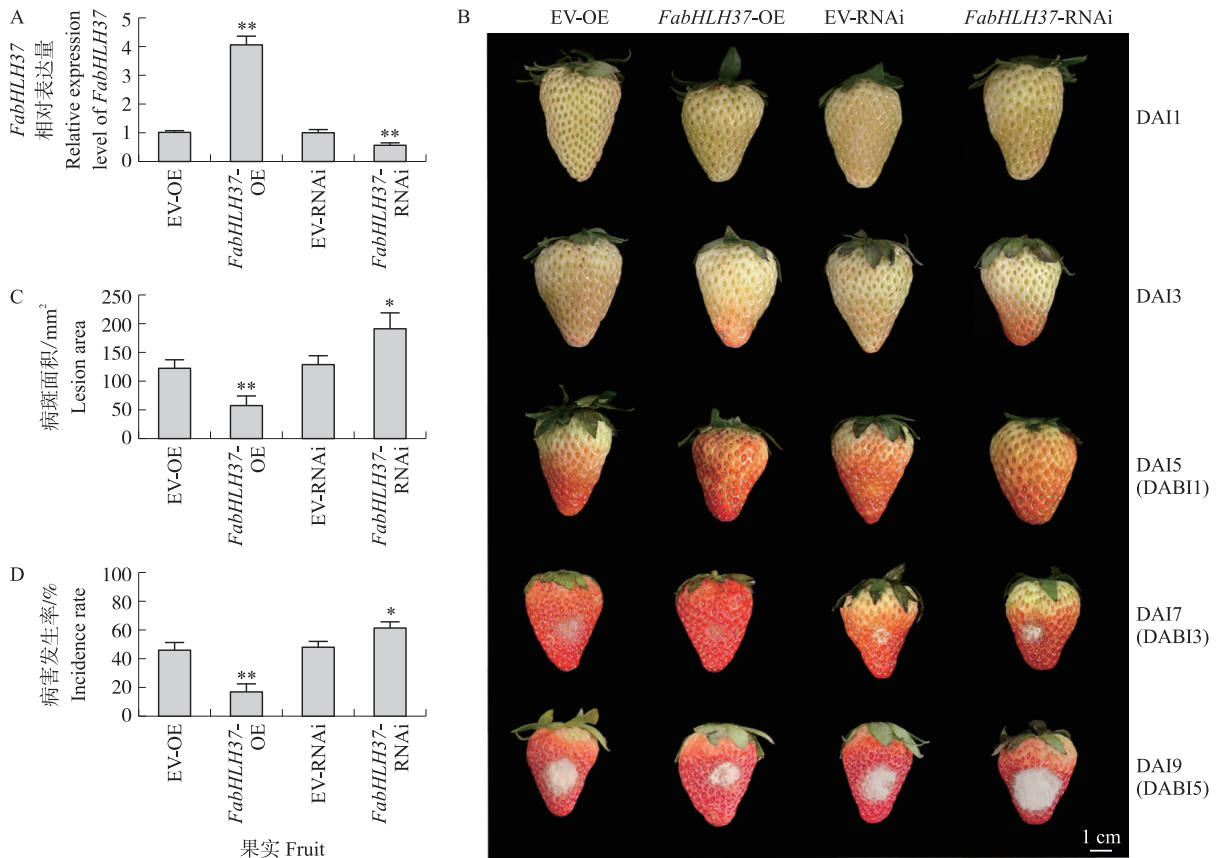


图 5 瞬时过表达和沉默 *FabHLH37* 果实接种灰霉菌的表型统计

Fig. 5 Phenotypic statistics of strawberry fruits inoculated with *B. cinerea* after transiently overexpression/silencing of *FabHLH37*

A. 瞬时表达 *FabHLH37* 的草莓果实第 5 天 *FabHLH37* 基因表达水平 The relative expression level of *FabHLH37* in strawberry fruit transiently expressing *FabHLH37* on the fifth day; B. 瞬时过表达和沉默 *FabHLH37* 的草莓果实接种灰霉菌的发病情况 Incidence of *FabHLH37*-OE and *FabHLH37*-RNAi strawberry fruits after *Agrobacterium tumefaciens* injection and *B. cinerea* inoculation; C. 瞬时表达 *FabHLH37* 的草莓果实接种灰霉菌第 3 天病斑面积 Lesion area of strawberry fruit transiently expressing *FabHLH37* inoculated with *B. cinerea* on the third day; D. 瞬时表达 *FabHLH37* 的草莓果实接种灰霉菌第 3 天发病率 The incidence rate of strawberry fruits transiently expressing *FabHLH37* on the third day after inoculation with *B. cinerea*.

DAI 为草莓果实注射农杆菌时间, DABI 为瞬时表达后的果实接种灰霉菌时间。DAI denotes days after *Agrobacterium tumefaciens* injection, and DABI denotes days after *B. cinerea* inoculation. EV: 空载体 Empty vector; OE: 过表达 Overexpression; RNAi: 核糖核酸干扰 Ribonucleic acid interference.

如图 6 所示: 多个茉莉酸 (JA) 合成和响应基因如 *FaJAZ1/2*、*FaMYC2*、*FaAOS*、*FaLOX*、*FaPDF1/1.2*、*FaOPR2* 表达量存在差异。*FaPDF1/1.2*、*FaLOX* 与 *FabHLH37* 的表达量呈正相关, 即在 *FabHLH37*-OE 的果实中表达量上升, 在 *FabHLH37*-RNAi 的果实中表达量下降。*FaOPR2* 的表达量在 *FabHLH37*-OE 果实中显著上调, 但在 *FabHLH37*-RNAi 果实中不显著。*FaJAZ1* 在 *FabHLH37*-OE 果实中表达量几乎不变, 但在 *FabHLH37*-RNAi 果实中, *FaJAZ1* 的表达量显著下降。*FaJAZ2*、*FaAOS* 的表达与 *FabHLH37* 的表达无相关性。*FaMYC2* 的表达与 *FabHLH37* 的表达呈负相关, 说明 *FabHLH37* 可能是通过参与 JA 合成和代谢途径

来调控灰霉病的抗性。此外,一些防御基因的表达量也发生了变化,如 *FaPR1/4/5-1*、*FaBG2-1*、*FaCHI3-1*、*FaSOD*、*FaPAL* 与 *FabHLH37* 的表达呈正相关。*FaPR10* 表达与 *FabHLH37* 无相关性。在检测的 *WRKY* 基因中,发现 *FaWRKY11/25* 受 *FabHLH37* 诱导,并在 *FabHLH37*-RNAi 果实中表达量下降。*FaWRKY1* 的表达与 *FabHLH37* 无相关性。上述结果说明 *FabHLH37* 过表达和沉默会影响一些防御基因的表达,从而共同调节草莓果实对灰霉病的抗性。

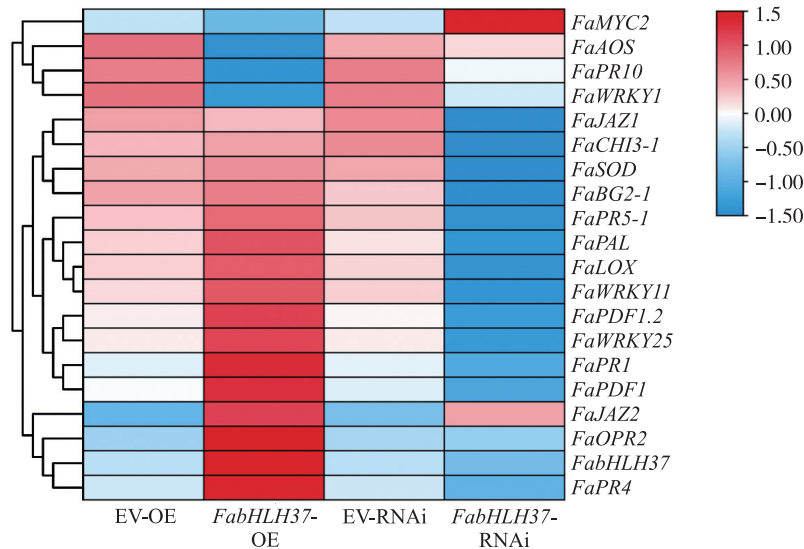


图 6 瞬时表达 *FabHLH37* 的草莓果实接种灰霉菌第 1 天相关抗性基因的表达量

Fig. 6 Expression levels of resistance-related genes in strawberry fruits transiently expressing *FabHLH37* on the first day after inoculation with *B. cinerea*

3 讨论

灰霉病是草莓生长过程中的主要病害之一,作为典型的坏死型真菌性病害,灰霉病能快速导致被感染的草莓果实腐烂,因而给草莓产业带来重大的经济损失。基因的转录调控会调节植物生长发育以及对各种胁迫的反应。研究表明,bHLH 家族转录因子在植物抗病过程中发挥重要作用。然而,关于 bHLH 转录因子调控草莓抗灰霉病的研究尚未见报道。本研究通过在感染灰霉病的果实中检测 *FabHLH37* 基因的表达量发现,*FabHLH37* 在果实接种灰霉菌 72 h 时表达量是对照的 4.3 倍,能够响应灰霉菌侵染,这与课题组前期转录组测序结果一致^[21],进而对转录因子 *FabHLH37* 进行研究,分析其调控草莓抗灰霉病的机制。

本研究对草莓 *FabHLH37* 基因克隆及生物信息学分析表明,该基因全长 789 bp,编码 262 个氨基酸,蛋白相对分子质量为 2.9×10^5 。研究发现拟南芥中 *AtbHLH106* 及苹果同源蛋白 *MdbHLH106* 均正向调控植物对盐胁迫的响应^[22-23],说明 *FabHLH37* 可能参与调控植物的多种胁迫反应。亚细胞定位结果表明 *FabHLH37* 定位在细胞核,与预测结果及拟南芥和苹果同源蛋白亚细胞定位结果一致。

研究表明,草莓果实瞬时表达体系可以用于基因功能验证。例如,Wang 等^[24]通过草莓果实瞬时表达试验证明 *FaWRKY11* 正调控草莓果实对灰霉病的抗性;*FaMAPK5/10* 在果实中瞬时过表达促进草莓成熟,过表达 *FaMAPK5* 的草莓果实灰霉病抗性显著增强^[25]。本研究中,首先在草莓果实中瞬时过表达和沉默 *FabHLH37*,并通过 qPCR 验证了瞬时表达体系的可靠性,进一步的灰霉菌接种试验发现,在草莓果实中瞬时过表达 *FabHLH37* 能使其表面灰霉菌病斑面积显著变小,而沉默 *FabHLH37* 则出现相反的结果,表明过表达 *FabHLH37* 能抑制灰霉菌的生长,而沉默 *FabHLH37* 则促进灰霉菌的生长,证明 *FabHLH37* 能正调控草莓灰霉病抗性。

植物激素在调控植物抗病过程中起重要作用。大量研究表明,水杨酸 (salicylic acid, SA) 主要在抗活体和半活体营养型病原菌中起作用,而乙烯 (ethylene, ET) 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 则在植物抗死体营养型病原菌中起作用^[26-27]。植物被坏死性真菌侵染后会立刻激活体内的 JA 信号通路并诱导下游防御基因的表达,其中 *PDF1.2* 基因被认为是依赖 JA 信号通路防御反应的标记基因,例如过表达 *GhbHLH171* 通过提高 *GhPDF1.2* 基因的表达量从而增强棉花对黄萎病菌和灰霉病菌的抗性^[28-29]。*OPR*、*LOX* 基因参与

JA 的合成反应,MYC2 是 JA 信号通路的核心转录因子,但该转录因子在不同植物中对灰霉病的抗性反应可能不同^[30-32]。在番茄中的研究发现,敲除 bHLH 转录因子 *SlJIG* 后,JA 介导的防御基因表达降低导致番茄对灰霉菌敏感^[33]。本研究发现 *FaPDF1/1.2*、*FaOPR2*、*FaLOX* 的表达量在 *FabHLH37*-OE 的果实中上升,而在 *FabHLH37*-RNAi 的果实中下降,其中 *FaPDF1* 在 *FabHLH37*-OE 果实中的表达量提高了 2.3 倍,而 *FaMYC2* 基因表达与 *FabHLH37* 呈负相关,说明 *FabHLH37* 可能通过参与 JA 信号通路来调控草莓对灰霉病的抗性。*PR* 基因作为植物抗病的标记基因,在抗真菌性病害中发挥重要作用。在番茄和烟草中,*PR1* 蛋白均能提高植株对疫霉病原菌的抗性^[34]。烟草 Nt**HLH149** 影响 *PR1/2/4* 的表达从而影响疫霉病的抗性^[35]。在植物中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶可协同提高植物抗病性^[36]。超氧化物歧化酶(SOD)与植物抗逆密切相关^[37]。异源过表达 *CmbHLH18* 拟南芥转基因株系通过提高 PAL、SOD 及 CAT 等防御酶的含量从而增强对坏死性真菌链格孢菌的抗性^[38]。在本研究中,*FaPR1/4/5-1*、*FaBG2-1*、*FaCHI3-1*、*FaSOD*、*FaPAL* 的表达均与 *FabHLH37* 呈正相关,说明 *FabHLH37* 可以通过提高一些防御基因的表达量增强草莓的抗病性。大量研究表明,WRKY 转录因子在植物抗病中也发挥着重要作用。本研究中,*FaWRKY11* 的表达也与 *FabHLH37* 呈正相关,而 *FaWRKY11* 能正调控草莓的灰霉病抗性^[24],表明 *FabHLH37* 可能通过 WRKY11 来间接调控草莓的灰霉病抗性。值得注意的是,除了能正调控以上防御基因的表达之外,作为负调控草莓抗病反应的 *FaWRKY25* 基因表达也受 *FabHLH37* 的诱导^[39],表明 *FabHLH37* 调控草莓灰霉病抗性机制较为复杂。总之,本研究初步验证了 *FabHLH37* 能正向调控草莓对灰霉病的抗性,为草莓抗病育种提供了参考,但其具体的抗病机制还需进一步研究。

参考文献 References:

- [1] 张运涛,雷家军,赵密珍,等. 新中国果树科学研究 70 年:草莓[J]. 果树学报,2019,36(10):1441-1452.
Zhang Y T,Lei J J,Zhao M Z,et al. Fruit scientific research in New China in the past 70 years:strawberry[J]. Journal of Fruit Science,2019,36(10):1441-1452(in Chinese with English abstract).
- [2] Edger P P,Poorten T J, VanBuren R,et al. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome[J]. Nature Genetics,2019,51(3):541-547.
- [3] 雷家军,代汉萍,谭昌华,等. 中国草莓属(*Fragaria*)植物的分类研究[J]. 园艺学报,2006,33(1):1-5.
Lei J J,Dai H P,Tan C H,et al. Studies on the taxonomy of the strawberry (*Fragaria*) species distributed in China[J]. Acta Horticulturae Sinica,2006,33(1):1-5(in Chinese with English abstract).
- [4] Petrasch S,Knapp S J, van Kan J A L,et al. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant Pathology,2019,20(6):877-892.
- [5] 张国珍,钟珊. 草莓灰霉病研究进展[J]. 植物保护,2018,44(2):1-10.
Zhang G Z,Zhong S. Advances in strawberry gray mold[J]. Plant Protection,2018,44(2):1-10(in Chinese with English abstract).
- [6] Cordova L G,Amiri A,Peres N A. Effectiveness of fungicide treatments following the Strawberry Advisory System for control of *Botrytis* fruit rot in Florida[J]. Crop Protection,2017,100:163-167.
- [7] Oliveira M S,Cordova L G,Marin M V,et al. Fungicide dip treatments for management of *Botrytis cinerea* infection on strawberry transplants[J]. Plant Health Progress,2018,19(4):279-283.
- [8] Cosseboom S D,Ivors K L,Schnabel G,et al. Within-season shift in fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* in California strawberry fields[J]. Plant Disease,2019,103(1):59-64.
- [9] Caseys C,Shi G J,Soltis N,et al. Quantitative interactions;the disease outcome of *Botrytis cinerea* across the plant Kingdom[J]. Genes Genomes Genetics,2021,11(8):jkab175.
- [10] Veronese P,Nakagami H,Bluhm B,et al. The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens[J]. The Plant Cell,2006,18(1):257-273.
- [11] AbuQamar S,Moustafa K,Tran L S. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*[J]. Critical Reviews in Biotechnology,2017,37(2):262-274.
- [12] 张燕,夏更寿,赖志兵. 植物抗灰霉病菌分子机制的研究进展[J]. 生物技术通报,2018,34(2):10-24.
Zhang Y,Xia G S,Lai Z B. Recent advances in molecular mechanisms of plant responses against *Botrytis cinerea*[J]. Biotechnology Bulletin,2018,34(2):10-24(in Chinese with English abstract).
- [13] Amorim L,Santos R,Neto J,et al. Transcription factors involved in plant resistance to pathogens[J]. Current Protein & Peptide Science,2017,18(4):335-351.
- [14] 于冰,田焯,李海英,等. 植物 bHLH 转录因子的研究进展[J]. 中国农学通报,2019,35(9):75-80.
Yu B,Tian Y,Li H Y,et al. Research progress of plant bHLH transcription factor[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2019,35(9):75-80(in Chinese with English abstract).

- [15] 陈亚铎,宋艳红,李刚,等. 草莓 FaFIT 在拟南芥中异源表达促进根系铁吸收[J]. 果树学报,2022,39(9):1562-1572.
Chen Y D, Song Y H, Li G, et al. Heterologous expression of strawberry FaFIT promotes iron uptakes by roots in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(9): 1562-1572 (in Chinese with English abstract).
- [16] Schaart J G, Dubos C, Fuente I R D L, et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruits [J]. The New Phytologist, 2013, 197(2): 454-467.
- [17] Li Y, Xu P B, Chen G Q, et al. FvbHLH9 functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis by forming a HY5-bHLH9 transcription complex in strawberry fruits [J]. Plant Cell and Physiology, 2020, 61(4): 826-837.
- [18] Han J X, Li X G, Li W H, et al. Isolation and preliminary functional analysis of *FvICE1*, involved in cold and drought tolerance in *Fragaria vesca* through overexpression and CRISPR/Cas9 technologies [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 196: 270-280.
- [19] Cheng Q, Dong L D, Gao T J, et al. The bHLH transcription factor GmPIB1 facilitates resistance to *Phytophthora sojae* in *Glycine max* [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(10): 2527-2541.
- [20] Bai Q X, Duan B B, Ma J C, et al. Coexpression of *PalbHLH1* and *PalMYB90* genes from *Populus alba* enhances pathogen resistance in poplar by increasing the flavonoid content [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 10: 1772.
- [21] Xiong J S, Zhu H Y, Bai Y B, et al. RNA sequencing-based transcriptome analysis of mature strawberry fruit infected by necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2018, 104: 77-85.
- [22] Ahmad A, Niwa Y S, Goto S, et al. bHLH106 integrates functions of multiple genes through their G-box to confer salt tolerance on *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126872.
- [23] Zou Q, Xu H F, Yang G X, et al. MdbHLH106-like transcription factor enhances apple salt tolerance by upregulating *MdNHX1* expression [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021, 145(2): 333-345.
- [24] Wang Y H, Zhao F X, Zhang G, et al. *FaWRKY11* transcription factor positively regulates resistance to *Botrytis cinerea* in strawberry fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 279: 109893.
- [25] Zhang Y T, Long Y, Liu Y T, et al. *MAPK5* and *MAPK10* overexpression influences strawberry fruit ripening, antioxidant capacity and resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Planta, 2022, 255(1): 19.
- [26] Kachroo P, Liu H Z, Kachroo A. Salicylic acid: transport and long-distance immune signaling [J]. Current Opinion in Virology, 2020, 42: 53-57.
- [27] Wang Y, Mostafa S, Zeng W, et al. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8568.
- [28] Goding C R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage [J]. Genes & Development, 2000, 14(14): 1712-1728.
- [29] He X, Zhu L F, Wassan G M, et al. GhJAZ2 attenuates cotton resistance to biotic stresses via the inhibition of the transcriptional activity of *GhbHLH171* [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(4): 896-908.
- [30] He Y H, Gan S S. Identical promoter elements are involved in regulation of the *OPRI* gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 47(5): 595-605.
- [31] Viswanath K K, Varakumar P, Pamuru R R, et al. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology [J]. Journal of Plant Biology, 2020, 63(2): 83-95.
- [32] Dombrecht B, Xue G P, Sprague S J, et al. MYC₂ differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2007, 19(7): 2225-2245.
- [33] Cao Y Y, Liu L, Ma K S, et al. The jasmonate-induced bHLH gene *SLJIG* functions in terpene biosynthesis and resistance to insects and fungus [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(5): 1102-1115.
- [34] Niderman T, Genet I, Bruyere T, et al. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans* [J]. Plant Physiology, 1995, 108(1): 17-27.
- [35] Wang W J, Zhang J H, Cao Y, et al. NtbHLH49, a jasmonate-regulated transcription factor, negatively regulates tobacco responses to *Phytophthora nicotianae* [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1073856.
- [36] 陈燕玲,岑光莉,孙婷婷,等. 植物几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶及其协同抗病性研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(7): 1394-1411.
Chen Y L, Cen G L, Sun T T, et al. Progress on plant chitinase and β -1,3-glucanase and their synergistic function in disease resistance [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(7): 1394-1411 (in Chinese with English abstract).
- [37] 关宇涵,王雨沙,李晓明,等. 草莓 *FveRPM1* 基因的鉴定及功能分析 [J]. 沈阳农业大学学报, 2022, 53(6): 641-649.
Guan Y H, Wang Y S, Li X M, et al. Identification and function analysis of *FveRPM1* gene in strawberry [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2022, 53(6): 641-649 (in Chinese with English abstract).
- [38] Ding Y F, Wang X M, Wang D D, et al. Identification of CmbHLH transcription factor family and excavation of *CmbHLHs* resistant to necrotrophic fungus *Alternaria* in *Chrysanthemum* [J]. Genes, 2023, 14(2): 275.
- [39] Jia S Z, Wang Y H, Zhang G, et al. Strawberry *FaWRKY25* transcription factor negatively regulated the resistance of strawberry fruits to *Botrytis cinerea* [J]. Genes, 2020, 12(1): 56.