DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2024.02.005

双链 RNA 对薇甘菊根基因 MmEXPA4 的靶向抑制

欧正慧^{1,2}, 王抗抗², 武 强², 钱万强², 刘 博^{2*}, 万方浩^{1,2*}

¹青岛农业大学植物医学学院,山东 青岛 266109;²岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心, 农业农村部农业基因数据分析重点实验室,中国农业科学院(深圳)农业基因组研究所,广东 深圳 518120

摘要:【目的】结合薇甘菊较强的节节生根能力的生物学特性,研发利用 RNAi 技术抑制薇甘菊根系生长 基因表达的生物防治技术,为进一步开发薇甘菊靶向防控技术奠定基础。【方法】利用同源比对方法,鉴 定出调控薇甘菊根系发育的关键基因(*MmEXPA*4),体外合成该基因的双链 RNA(dsMmEXPA4),利用 dsMmEXPA4 注射薇甘菊根部,研究其对薇甘菊根系生长的作用。【结果】与对照组相比,dsMmEXPA4 处 理 30 d 后,所有不定根的数量、鲜重和最长不定根的长度均显著降低。qRT-PCR 检测结果表明,在 dsMmEXPA4 处理后第4 和第5天, *MmEXPA*4 基因的表达量显著下调,沉默效率分别为 43.96% 和



开放科学标识码 (OSID 码)

52.11%。此外,通过 Fluorescent Stereo Microscope Leica M165 FC 发现,被荧光标记的 dsMmEXPA4 能在根系中测检到较强的绿色荧光信号。【结论】MmEXPA4 基因可作为抑制薇甘菊根系发育及快速生长的潜在靶点,为利用 RNA 干扰技术生物防治薇甘菊提供理论基础。

关键词:薇甘菊;双链 RNA;入侵杂草; MmEXPA4; 抑制植株生长

Targeted inhibition of *Mikania micrantha* root gene *MmEXPA*4 by double-stranded RNA

OU Zhenghui^{1,2}, WANG Kangkang², WU Qiang², QIAN Wanqiang², LIU Bo^{2*}, WAN Fanghao^{1,2*}

¹College of Plant Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen, Guangdong 518120, China

Abstract: [Aim] Based on the biological characteristics of stronger rooting ability of each internode in *Mikania micrantha*, a biocontrol technology that inhibits the expression of genes related to root growth by RNAi was developed, providing a foundation for further development of targeted control technology of *M. micrantha*. [Method] A key gene involved in the root development of *M. miccrantha* (*MmEXPA4*) was identified by the homologous comparison method, and the double-stranded RNA (dsMmEXPA4) was further synthesized *in vitro*. Then, dsMmEXPA4 was injected into *M. micrantha* roots to investigate its effect on root growth. [Result] The number of adventitious roots and their fresh weight, and the length of the longest adventitious root under the dsMmEXPA4 treatment after 30 days were significantly reduced compared to those under the control condition. In addition, the gene expression of MmEXPA4 was significantly downregulated at days 4 and 5 post-injection. The silencing efficiency of dsMmEXPA4 was 43% on day 4 and 52% on day 5. Based on the Fluorescent Stereo Microscope Leica M165 FC images, it was found that fluorescently labeled dsMmEXPA4 could be detected through a strong green fluorescence signal in the root tissue. [Conclusion] The *MmEXPA4* gene could be used as a potential target to inhibit the root development and rapid growth of *M. micrantha*, providing a theoretical basis for further development of biological control technology through RNA interference.

Key words: Mikania micrantha; double-stranded RNA; invasion of weeds; MmEXPA4; inhibit plant growth

收稿日期(Received): 2022-12-07 接受日期(Accepted): 2023-02-26

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32072490)

作者简介:欧正慧,女,硕士研究生。研究方向:入侵生物防治。E-mail: ouzhenghui0403@163.com

^{*}通信作者(Author for correspondence),刘博, E-mail: liubo03@caas.cn;万方浩, E-mail: wanfanghao@caas.cn

薇甘菊 Mikania micrantha Kunth 是菊科 Compositae 假泽兰属 Mikania 多年生草质藤本植物,原 产于南美洲和中美洲(何海燕,2016)。1919年,薇 甘菊入侵香港,这是薇甘菊作为杂草在我国首次出 现,之后便快速蔓延(Huang & Peng, 2016)。1984 年薇甘菊入侵深圳(王伯荪等,2003),2008年后已 普遍入侵珠江三角洲地区(巫添辉等,2014)。薇甘 菊既可通过产生大量种子进行有性繁殖、扩散,又 能通过极强的无性繁殖能力进行传播。此外,薇甘 菊的茎节具有节节生根能力,无性繁殖快,根生长 迅速,能快速覆盖周围植物,导致周围植物无法进 行光合作用而枯萎,严重时则造成死亡。因此,薇 甘菊被认为是世界十大有害杂草之一,有"植物杀 手"之称,被我国林业部定为全国检疫性有害生物 (邵婉婷等,2002;周茂建,2004)。薇甘菊的入侵 给农业和林业造成了严重威胁和巨大的经济损失, 其控制管理问题已经成为世界性难题(徐高峰等, 2014)。目前,对薇甘菊的防控方法主要包括植物 检疫、人工或机械铲除、化学除草剂施用、天敌昆 虫、真菌柄锈菌控制和改善生物群落结构等综合防 治策略(高旭华等,2012;李云琴等,2019;李志杰 和黄江华,2018; 泽桑梓等,2013; 宋雪等,2021; Macanawai et al., 2015) 《虽然这些方法对防治薇甘 菊有一定效果、但存在效率低、经济成本高等缺点 (徐高峰等,2017)。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种广 泛存在于生命体中,高度保守的转录后基因沉默技 术(Fire et al., 1998)。外源双链 RNA (doublestranded RNA, dsRNA)能够以碱基互补配对的方 式,利用细胞内源性 RNAi 机制,降解同源靶标 mR-NA (Ghildiyal & Zamore, 2009; Whangbo & Hunter, 2008)。近年来,基于 RNAi 技术的研究被应用于鞘 翅目、半翅目、鳞翅目等昆虫的防治(Guo et al., 2017; Palli, 2014)。Mao et al. (2007)利用 RNAi 技 术, 靶向基因(CYPAE14)的烟草 Nicotiana tabacum L.抑制棉铃虫 Helicoverpa armigera (Hübner)体内的 表达。Reddy et al. (2016)以棉铃虫几丁质酶基因 chitinase 为靶标构建 dsRNA 表达的转基因烟草和 番茄 Solanum lycopersicum L.。此外,利用 dsRNA 沉 默 V-ATPase 基因可以实现防除苹果绵蚜 Eriosoma lanigerum (Hausmann) (Guo et al., 2022)、三叶斑潜 蝇 Liriomyza trifolii (Burgess) (Chang et al., 2021)、

番茄潜叶蛾 Phthorimaea absoluta (Meyrick)(Rahmani & Bandani,2021)等害虫。利用 RNAi 技术在 植物上的研究也有相关报道,如 Kiselev et al. (2021)通过研究外源诱导 RNAi 的生理条件和 dsRNA 在拟南芥 Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.上 的应用途径表明,dsRNA 在白天后期、土壤低温度 条件下应用 NPTII 抑制效果好,且涂抹、喷施和移 液处理比渗透和接种处理抑制效果强。

目前,利用 RNAi 技术在控制杂草生长方面的 研究较少,例如,孟山都公司应用 RNAi 治理草甘膦 抗性杂草(陈良和苏少泉,2013)。而应用 RNAi 技 术在薇甘菊上的研究,目前仅见 Mai et al. (2021) 利用 3 种类型的 RNAi 分子抑制了薇甘菊叶绿素 a/b 结合蛋白的表达,致使薇甘菊叶片变黄并最终 枯萎,这是首次对薇甘菊基因生物学功能的研究。 本文从控制薇甘菊根的生长作为出发点,研究利用 RNAi 技术抑制根生长相关基因的表达对植株的影 响,为通过 RNAi 技术抑制薇甘菊生长发育基因的 靶向防控技术研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物材料:2022 年 2 月在广东省深圳市大鹏新 区农业科学院农场采集薇甘菊种子。将种子置于 含湿滤纸的塑料培养皿(直径 9 cm)中,培养皿中 每天喷水,保持种子水分充足。种子生根发芽后, 将带有 2 片子叶的幼苗转移到含有霍格兰氏液体 营养液的 96 孔黑色液体培养盒中,于光周期 L:D =16 h:8 h、温度 25 ℃、相对湿度约 80%的温室中 培养,用含有 4 片真叶的幼苗进行试验。

试剂:Plant Total RNA Isolation Kit Plus (福际 生物技术公司)、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒(碧云天生物技术公司)、pMD[™] 18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa 生物技术公司)、 T7 RNAi Transcription Kit (诺唯赞生物技术公司)、 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit、2×Hieff[®] Robust PCR Master Mix、DH5α 化学感受态细胞、2× Hieff Canace[®] Gold PCR Master Mix 高保真酶预混 液和 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (YESEN 生物技术公司)。

仪器: PCR 扩增仪 T100 thermal cycler (美国 Bio-Rad 公司)、微量高速冷冻离心机 M1324R (中 国瑞沃德公司)、微量高速离心机 M1324 (中国瑞 沃德公司)、超微量紫外分光光度计 ND-ONEC (美国 Thermo Fisher 公司)、双稳定时电泳仪 DYY-2C (中国北京六一公司)、植物组织研磨仪 (中国宁波新芝公司)、Fluorescent Stereo Microscope Leica M165 FC (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 候选靶基因的筛选 根据文献筛选出在拟 南芥中已明确具有与根系发育相关功能的基因 AtEXPA4 (Liu et al.,2021),通过 Blastp 比对,以 evalue 值<e⁻⁵、Identity>80%为标准,筛选出薇甘菊的 候选基因,通过同源比对,找到直系同源基因。以 相同方法筛选菊花脑 Chrysanthemum nankingense (Nakai) Tzvel、向日葵 Helianthus annuus L.和莴苣 Lactuca sativa Linn.的候选基因。使用 MEGA 11 软 件的 neighbor-joining 方法构建系统发育树[参数设 置为 P-distance modeling, bootstrap (1000 次)检 测]。应用 ClustalW 算法对筛选后的薇甘菊的关键 候选基因与拟南芥 EXPA 基因的氨基酸序列进行 多序列比对,鉴定关键候选基因的特异序列。

1.2.2 转录组数据分析 从 NCBI (SRR8857616~ SRR8857640)下载 *M. micrantha* 不同组织的转录组 数据用于后续分析(Liu *et al.*,2020)。为了消除测 序过程中产生的误差,根据以下标准过滤不可靠的 reads:(1) 50%的 read 基准质量值 Phred 低于 20%;(2)一个 read 包含超过 10%的歧义残基'N'。 过滤后,使用 HISAT2 v2.1.0 里的默认参数,将高质量的 reads 映射到从 NCBI (PRJNA528368)下载的 *M. micrantha* 参考基因组。使用 Samtools v1.1.3 处理后,并用 HTSeq-count v2.1.0 计算映射的读计数, 然后计算候选基因的表达量 (transcripts per million, TPM)。

1.2.3 RNA 提取与基因克隆 使用试剂盒提取薇 甘菊叶片总 RNA, cDNA 第一链合成参照试剂盒说 明书进行。利用软件 Primer Premier 5 设计 PCR 引 物(表 1), PCR 扩增的反应体系包括 cDNA 1 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 2×Mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL, 离心混匀后在 PCR 仪 上进行,反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃变性 10 s;55 ℃退火 20 s;72 ℃ 延伸 10 s;循环 35 次;72 ℃终延伸 7 min。用 1%凝 胶电泳检测目的条带大小。目的片段的回收及纯 化按照试剂盒说明书进行。将纯化后的目的片段 与 pMD18-T vector 连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,涂板、摇菌,取部分菌液进行 测序验证,将测序正确的菌液提质粒后置于-20 ℃ 冰箱存放。

引物名称	正向(5′ to 3′)	反向(5' to 3')	目的
Name of primer	Forward $(5' \text{ to } 3')$	Reverse $(5' \text{ to } 3')$	Purpose
MmEXPA4	ACTGCTCACGCCACCTTCTAC	GACTCATCCATTCGGTCCTTG	基因克隆 Gene clone
dsMmEXPA4	TAATACGACTCACTATAGGG	TAATACGACTCACTATAGGG	dsRNA 合成 Synthesis of dsRNA
	ACTGCTCACGCCACCTTCTAC	GACTCATCCATTCGGTCCTTG	
qMmEXPA4	GTAACTGGGGTCAAAACTGGCA	CCAAGATGTGGAAGTGCGATG	qRT-PCR
qUBQ10	TGCCGACTACAACATCCAGAA	CCGCAGTAATGCCGATCAAA	qRT-PCR
qGAPDH	TCCAGGAACCCAGACGAGAT	AGACCCTCAACAATGCCAAA	qRT-PCR

表1 基因克隆、dsRNA 合成和荧光定量 PCR 的引物 Table 1 Primers for gene cloning, dsRNA synthesis and fluorescence quantitative PCR

1.2.4 dsRNA 的合成 在上述克隆步骤中扩增目 的片段引物的 5'端加上 T7 启动子序列作为 dsRNA 合成的扩增引物,通过 PCR 合成带有 T7 启动子的 模板,配制相应的转录反应体系:10×Transcription Buffer 2 μ L,NTP Mix 8 μ L,T7 Enzyme Mix 2 μ L, cDNA 2 μ g,ddH₂O 定容至 20 μ L,瞬时离心后放置 于 PCR 仪中 37 ℃孵育 3 h,然后进行双酶消化,在 反应液中添加 RNase-free H₂O 17 μ L、DNase I 1 μ L、RNase T1 2 μ L,瞬时离心后放置于 PCR 仪中 37 ℃孵育 30 min,电泳检测转录产物。对转录后的 产物进行纯化,使用超微量分光光度计 Nanodrop

once 检测其浓度。

1.2.5 荧光标记示踪 为了观察 dsRNA 进入植物 根系的过程,采用 Fluorescein RNA Labeling Mix 标 记 dsRNA:在 dsRNA 合成体系中加入 Fluorescein RNA Labeling Mix,使用 T7 Mix 在聚合过程中将 Fluorescein RNA Labeling Mix 作为底物加入到新合 成的 dsRNA 以合成带 Fluorescein-12-UTP 标记 dsRNA,参照 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒的说 明书制备 dsRNA,电泳检测 dsRNA 完整性。将制 备好的荧光药物采用浸泡方式处理薇甘菊根系,5 d 后在荧光显微镜下诱导荧光信号观察根系。 1.2.6 dsRNA 对靶基因的抑制 选取根系长势一 致的薇甘菊,在根部注射 175 ng · μL⁻¹的 dsRNA,水 培法培养,将处理后的植株置于光周期L:D=16 h :8 h、温度 25 ℃、相对湿度约 80%的温室中培养,观 察并记录形态表型。为分析 RNAi 对靶基因表达的 影响,分别从 dsRNA 和 CK(清水作对照)处理后 1、 2、3、4、5、6 d 的植株中提取根的总 RNA,按照上述方 法合成 cDNA,采用 qRT-PCR 检测目的基因的表达 水平。选择基因 GAPDH (AGI: AT1G13440) 和 UBQ10 (AGI: AT4G05320)作为 qRT-PCR 的内参基 因(Czechowski et al., 2005)。试验进行3次生物学重 复、每个生物重复进行2次技术重复。在表型效应 方面,以 dsRNA 和 CK (清水作对照)作为处理,每个 处理进行10个生物学重复。处理30d后统计植株 形态指标根长、不定根数目、根的鲜重。

1.2.7 统计分析 采用 $2^{-\triangle Ci}$ 法计算基因表达量, qPCR 数据以平均值±标准误差计算,用独立样本 *T* 检验确定均数之间差异的显著性,用 GraphPad 8.0 和 SPSS 25 软件进行统计分析和作图(p < 0.05)。

2 结果与分析

2.1 薇甘菊靶标基因的鉴定

利用同源比对的方法,将拟南芥 AIEXPA4 的氨 基酸序列与薇甘菊、向日葵、菊花脑和莴苣的参考 基因组氨基酸序列进行 Blastp 比对,共鉴定 17 个 EXPA4 直系同源基因,其中薇甘菊 7 个、向日葵 3 个、菊花脑 6 个、莴苣 1 个(表 2)。

进化树分析表明,来自5个物种的 EXPA 蛋白

共聚为4个分支(图1):薇甘菊(Mm13G031031、 Mm17G037504 和 Mm07G018251) 与向日葵(XP 022037293.1)、莴苣(XP 023755180.1)和菊花脑 (CHR00077221-RA 和 CHR000737008-RA) 聚为一 个分支,表明这些基因可能具有相同的功能。而菊 花脑(CHR00082705-RA、CHR00064184-RA)分别 各单独成为一个分支,表明这2个基因可能功能分 化。此外,薇甘菊(Mm08G020636、Mm01G003245、 MmUnG044647 和 Mm14G033446) 以及向日葵(XP 021973805.1 和 XP 022018223.1) 和 菊 花 脑 (CHR00009179-RA、CHR00006829-RA) 与拟南芥 (EFH57928.1)扩展蛋白 EXPA 聚为一个分支,与 薇甘菊的另外6个候选基因相比,薇甘菊 (Mm14G033446)与拟南芥(EFH57928.1)有较近的 亲缘关系,且 Mm14G033446 的 identity 最高,相似 度为 84.49%, e-value 高达 1.39e⁻¹⁶⁰。故鉴定基因 Mm14G033446 为关键候选基因,该基因的核苷酸 序列见表3。

已知拟南芥基因 EFH57928.1 (*AtEXPA*4)属于 扩展蛋白 EXPA 亚家族,通过氨基酸比对分析结果 显示(图 2),薇甘菊 Mm14G033446 与拟南芥 EFH57928.1 具有较高的保守型。结构域分析发 现,薇甘菊 Mm14G033446 具有典型的扩展蛋白结 构特征,在 N 端有 8 个保守的半胱氨酸残基和一个 HFD 保守结构域,C 端有 4 个高度保守的色氨酸残 基(罗云等,2017),因此推测薇甘菊 Mm14G033446 与拟南芥 EFH57928.1 行使相同的功能。

Table 2 Selected targeted genes						
己功能验证基因 Functional verification of genes	具有功能 Functions available	Blastp 比对后统 Genes screened after	等选出的基因 Blastp comparison	相似性 Identity/%	e 值 e-value	
AtEXPA4	敲除 AtEXPA4 基因	薇甘菊 M. micrantha	Mm07G018251	82.072	$9.74e^{-148}$	
(Gene ID: AT2G39700;	使主根生长缓慢		Mm17G037504	80.934	$4.71e^{-156}$	
GenBank: EFH57928.1)	AtEXPA4 gene is kno-		Mm13G031031	80.156	$2.24e^{-157}$	
	cked out to slow the		Mm08G020636	82.278	$9.51e^{-165}$	
	growth of axial root		MmUnG044647	84.190	$1.39e^{-160}$	
			Mm01G003245	84.190	$9.51e^{-165}$	
			Mm14G033446	84.490	$1.39e^{-160}$	
		向日葵 H. annuus	XP_022018223.1	85.039	$1.15e^{-165}$	
			XP_021973805.1	86.885	$1.34e^{-161}$	
			XP_022037293.1	82.879	$7.59e^{-160}$	
		菊花脑 C. nankingense	CHR00006829-RA	85.259	$8.37e^{-164}$	
			CHR00073708-RA	81.712	$1.03e^{-160}$	
			CHR00077221-RA	80.934	$2.23e^{-159}$	
			CHR00009179-RA	83.665	$2.95e^{-158}$	

表 2 筛选出的靶向基因 Table 2 Selected targeted genes







表 3 筛选出的靶向基因序列 Table 3 Selected targeted gene sequences

基因名称 Name of gene	靶基因序列 Target gene sequence
Mm14G033446	ATGGAGGTCAGGGGTGTCGGTTATGCAGCAATTCTGTGTGTG
	${\tt CGGCGGACAATGGGAGACTGCTCACGCCACCTTCTACGGCGGCAATGATGCCTCCGGCACCATGGGAGGTGCATGTGGGTA$
	${\tt CGGTAACCTATATAGCCAAGGCTATGGTGTGAATACAGCGGCCTTGAGTACTGCTCTGTTCAACAATGGGCTGAGCTGCGGT$
	GCATGTTTCGAGATTAAGTGTGTGGATGACCCACAGTGGTGCCATCCAGGCAGCCCCTCGATTTTCATAACAGCAACCAAC
	TTCTGTCCACCTAATTTTGCTCAGCCAAGTGATAATGGTGGGTG
	TATGTTTCTCAAGATTGCCGAGTATCGAGCCGGAATAGTTCCTGTTTCTTACCGCCGGATCCCATGTCGAAAGCAAGGCGGG
	${\tt GTAAGATTCACCATCAACGGATTCCGTTACTTCAATTTGGTTCTCATCACCAACGTTGCTGGAGCCGGGGACATAACGCAAG}$
	CATEGETGAAAGGATCAAGGACCGAATGGATGAGTCTTAGCCGTAACTGGGGTCAAAACTGGCAATCAAATGTTGTGCTTG
	TTGGCCAATCACTTTCATTTAGGGTTAGAGGCAGTGATCATCGCACTTCCACATCTTGGAACATTGCCCCAGCTGACTGGAA
	ATTTGGTCAAACCTTTGTCGGGAAAAATTTCCGAGTCTAG



Fig.2 Amino acid multi-sequence comparison among key candidate genes of M. micrantha and A. thaliana

2.2 薇甘菊 EXPA4 基因的组织表达模式

在统计分析之前,从数据集中过滤极低表达或 无表达的基因(在每个组织中所有生物重复的 TPM 值 < 5)。由于候选基因 MmUnG044647 和 Mm01G003245 的平均 TPM 值范围均低于 5. 故剔 除。本研究基于薇甘菊 EXPA4 候选基因的 5 个拷 贝进行了不同组织花、叶、根、茎和茎尖的转录组数 据分析(图 3)。结果发现, Mm14G033446 和 Mm13G031031 基因在根中的表达量最高,且 Mm13G031031 基因在 5 个组织中的平均 TPM 值范 围在 6.37~311.38, Mm14G033446 基因在 5 个组织 中的平均 TPM 值在 5.37~78.02; Mm08G020636 基 因在根和茎中表达较低, Mm07G018251 和 Mm17G037504 在花中高表达,后者在茎中表达也 较低,Mm07G018251、Mm17G037504、Mm08G020636 基因在 5 个组织中的平均 TPM 值范围分别在 0.18 ~118.87、15.25~298.82、0.00~5.02。但由于 Mm14G033446的 identity 最高,相似度为 84.49%, 证实了 Mm14G033446 基因为关键候选基因的事 实, Mm14G033446 基因在根中高表达, 在花和叶的 表达量均低于根和茎,茎尖的表达量最低,根的表 达量比花和叶分别高出 4.05 和 3093 倍,比茎高出 0.55 倍,比茎尖高出13.51倍。

2.3 dsRNA 对薇甘菊内源性靶基因的抑制效果

将标记好的 dsRNA 溶液与营养液混合培养植物 5 d 后,通过 Fluorescent Stereo Microscope Leica

M165 FC 进行验证。结果显示,在显微镜下观察到 植株根系带有较强的绿色荧光信号,表明处理后的 根系从溶液中吸收和/或吸附了标记的 dsRNA(图 4),能进行后续的 RNAi 过程(下文将 Mm14G033446命名为 *MmEXPA*4)。

 微带菊 MmEXPA4 基因的 qRT-PCR 检测结果 表明,在 CK和 dsMmEXPA4 处理后1d的 MmEX-PA4 的相对平均表达量分别为 0.84和 0.74,两者间 无显著差异;处理后第2和第3天靶基因 MmEX-PA4 的表达与第1天的表达量有相同的模式,即在 CK和 dsMmEXPA4 处理下, MmEXPA4 的基因表达 无显著变化。然而,处理第4、5天时靶基因的表达 无显著下调,沉默效率分别为 43.96%和52.11%,到处 理后第6天靶基因的表达又恢复到正常水平。此 外,处理后第1、2、3、4、5和6天的对照组(CK)平 均表达量比处理组(dsMmEXPA4)分别高出0.13、 0.04、0.06、0.78、1.09和 0.14倍(图5)。





图 4 根系浸泡荧光标记 dsRNA 溶液 5 d 后 dsRNA 摄取的显微镜观察

Fig.4 Microscopic observation of dsRNA uptake in roots soaked in fluorescently labeled dsRNA solution for 5 days

A:激发光;B:荧光素标记的 dsMmEXPA4;C:叠加。

A: Excitation light; B: Fluorescein labeled dsMmEXPA4; C: Combined labeling.





Data analysis was conducted by t-test and the difference was significant (P < 0.05). Each bar chart represents the average of n = 3 biological replicates and the standard error of the mean. *: Significant difference between control and RNAi treatment; ns: No significant difference.

2.4 dsRNA 对薇甘菊植株的生长影响

选取含有4片真叶的薇甘菊幼苗,在CK和 dsMmEXPA4 处理下,观察植株的形态变化并记录 数据。处理后第30天的根系表型结果表明,与对 照组相比,dsMmEXPA4处理后所有不定根的数量、 鲜重和最长不定根的长度均显著降低(图6)。正 常生长条件下(CK)最长不定根的平均长度为21.32 cm,dsMmEXPA4处理后最长不定根的平均长度为 12.36 cm, 对照组最长不定根的平均长度(CK)比处 理组(dsMmEXPA4) 高 0.72 倍,处理组 (dsMmEXPA4)最长不定根的平均长度降低了 42.03%。正常生长条件下(CK)所有不定根的平均 鲜重为 0.09 g, dsMmEXPA4 处理后所有不定根的 平均鲜重为0.03g,对照组所有不定根的平均鲜重 (CK)比处理组(dsMmEXPA4)高 1.56 倍,处理组 (dsMmEXPA4)所有不定根的平均鲜重降低了 60.94%。正常生长条件下(CK)所有不定根的平均 数量为 37.00, dsMmEXPA4 处理后所有不定根的平 均数量为18.40.对照组所有不定根的平均数量 (CK)比处理组(dsMmEXPA4)高 1.01 倍,处理组 (dsMmEXPA4)所有不定根的平均数量降低了 50.27%。



图 6 dsMmEXPA4 处理 30 d 后植株样品 的表型结果 Fig.6 Phenotypic results of plant samples treated with dsMmEXPA4 for 30 days

3 讨论

在本研究中,处理植株5d后,荧光显微镜结果显示,在根系中观察到标记的dsMmEXPA4溶液被根吸收和/或吸附,标记后的dsMmEXPA4在植株

根系中观察到较强的绿色荧光信号,特别是在根系 的形态学下端观察到的绿色荧光信号尤为强烈,推 测 dsMmEXPA4 溶液递送到植株体内被植物吸收, 能进行后续的 RNAi 过程。本研究 qRT-PCR 结果 显示,在CK和dsMmEXPA4处理后第1、2和3天, 靶基因 MmEXPA4 的表达量无显著差异,对照组平 均表达量(CK)比处理组(dsMmEXPA4)分别高 0.13、0.04 和 0.06 倍, 两者间无显著变化, 推测这可 能与植物的内源性防御机制有关,通过外源诱导 dsRNA 注射到植株根部, 触发了薇甘菊的防御机 制,导致基因干扰效率降低,目的基因表达水平升 高。然而,处理第4、5天时靶基因的表达显著下 调,推测随着 RNAi 分子数量的不断增加,被植物宿 主细胞吸收,目的基因的表达最终被抑制,但是干 扰效率不是特别高,本研究施用的 dsRNA 浓度为 175 ng · μL⁻¹, 推测可能是施用的浓度低, 后续可以 考虑提高 dsRNA 的浓度。处理后第6天靶基因的 表达恢复到正常水平, 推测 dsRNA 可能存在降解 的情况。有研究表明,在昆虫中,dsLsStre 喂食灰飞 虱 Laodelphax striatellua (Fallen)后,对靶基因表达 量的抑制率为46%。但是结合纳米材料壳聚糖和 COD 包裹后, RNAi 效率显著提高,抑制率分别为 78%和84%(周晨等,2021)。将纳米载体和 dsRNA 混合液滴在大豆蚜 Aphis glycines Matsumura 体壁上 48 h 后,其体内靶基因表达量显著下调,干扰效率 高达95.4% (Zheng et al., 2019)。为提高 dsMmEX-PA4 对薇甘菊的干扰效率,后续可以结合纳米材料 进行包裹,缓慢释放递送 dsRNA,以维持抑制靶基 因的干扰效果和持续时间。

dsRNA 的传递不仅能降低靶基因 mRNA 的表 达水平,还能引起表型变化。在本研究中, dsMmEXPA4 处理薇甘菊根系 30 d 后,与对照组 (CK)相比,dsMmEXPA4 处理后的最长不定根长度 显著变短。对所有不定根的数量、鲜重和最长不定 根长度统计发现,与对照组(CK)相比,处理组 (dsMmEXPA4)最长不定根的平均长度、所有不定 根的平均鲜重和所有不定根的平均数量分别降低 了 42.03%、60.94%和 50.27%,表明根系表型差异 与靶基因沉默相关。

本研究结果表明, 靶基因表达量的抑制以及植 株根变短的特征, 进一步证实了 MmEXPA4 对根的 生长有积极影响, 在植物生长发育过程中起重要的 作用,也为植物根的生长发育与扩展蛋白的参与提供了参考证据。本研究仅在实验室内进行,今后还需要进一步论证该生物除草剂最合适的浓度、剂量和施用时间,以及通过田间试验来验证使用 dsRNA 生物除草剂抑制入侵植物薇甘菊的可行性,做好生态安全性等方面的评估。

参考文献

- 陈良, 苏少泉, 2013. 草甘膦抗性杂草现状及利用 RNA 干 扰进行治理的启示. 世界农药, 35(5): 30-33.
- 高旭华, 方越, 沈雪峰, 陈勇, 陈明周, 2012. 草甘膦与 2, 4-D 复配对薇甘菊防效的研究. 中国农学通报, 28(21): 237-241.
- 何海燕,2016. 微甘菊的防治及其利用研究趋势. 现代国艺 (16):50-51.
- 李志杰, 黄江华, 2018. 薇甘菊防治研究进展. 仲恺农业工 程学院学报, 31(1): 66-71.
- 李云琴,季梅,刘凌,户连荣,张知晓,泽桑梓,2019.云南 省林地薇甘菊防控研究进展.生物安全学报,28(1):1-6.
- 罗云,张超,付建新,董彬,胡绍庆,赵宏波,2017.桂花扩展蛋白基因家族的鉴定和表达分析.农业生物技术学报, 25(8):1289-1299.
- 邵婉婷,韩诗畴,黄寿山,刘文惠,李开煌,彭统序,李丽 英,2002. 控制外来杂草薇甘菊的研究进展. 广东农业科 学(1):43-45,48.
- 宋雪, 王辉, 孙延军, 咎启杰, 2021.5种化学除草剂对薇 甘菊防治效果及对其他植物的影响. 植物保护, 47(4): 269-275.
- 王伯荪,廖文波, 昝启杰, 李鸣光, 周先叶, 高三红, 2003. 薇甘菊 Mikania micrantha 在中国的传播. 中山大学学报 (自然科学版), 42(4): 47-50, 54.
- 巫添辉,杨丽华,李运龙,2014. 外来入侵种薇甘菊在惠州 的分布与危害. 吉林林业科技,43(6):40-43.
- 徐高峰, 申时才, 张付斗, 2014. 异质环境下入侵植物薇甘菊 的适应性与繁殖特性. 生态环境学报, 23(8): 1258-1264.
- 徐高峰,岳英,申时才,郭晋,金桂梅,张付斗,张玉华, 2017. 薇甘菊防除后抑制其再次入侵的几种防治措施初 探. 生态环境学报, 26(6):911-918.
- 周茂建,2004.我国检疫性森林有害生物发生现状及其分析.植物检疫,18(2):97-100.
- 泽桑梓,苏尔广,闫争亮,翟雍善,季梅,2013. 薇甘菊颈盲 蝽对薇甘菊的控制作用. 西部林业科学,42(1):46-52.
- 周晨,朱先敏,朱凤,张海波,韩召军,杨荣明,王康旭, 2021. 纳米粒子载体对灰飞虱 RNAi 效率的影响. 昆虫学 报,64(10):1153-1160.

- CHANG Y W, WANG Y C, ZHANG X X, IQBAL J, DU Y Z, 2021. RNA interference of genes encoding the vacuolar-AT-Pase in *Liriomyza trifolii*. *Insects*, 12(1): 41.
- CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, UDVARDI M K, SCHEIBLE W, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Ar-abidopsis*. *Plant Physiology*, 139(1): 5–17.
- FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, KOSTAS S A, DRIVER S E, MELLO C C, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis ele*gans. Nature, 391: 806–811.
- GHILDIYAL M, ZAMORE P D, 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2): 94–108.
- GUO L, LIANG P, FANG K, CHU D, 2017. Silence of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression decreases cyantraniliprole susceptibility in *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 142: 162–169.
- GUO Y, FAN Y J, TENG Z W, WANG L Y, TAN X M, WAN F H, ZHOU H X, 2022. Efficacy of RNA interference using nanocarrier-based transdermal dsRNA delivery system in the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum. Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 110(2): e21888.
- HUANG F F, PENG S L, 2016. Intraspecific competitive ability declines towards the edge of the expanding range of the invasive vine *Mikania micrantha*. *Oecologia*, 181: 115–123.
- KISELEV K V, SUPREN A R, ALEYNOVA O A, OGNEVA Z V, DUBROVINA A S, 2021. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 10: 264.
- LIU W M, XU L A, LIN H, CAO J S, 2021. Two expansin genes, *AtEXPA4* and *AtEXPB5*, are redundantly required for pollen tube growth and *AtEXPA4* is involved in primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes*, 12(2); 249.
- LIU B, YAN J, LI W H, YIN L J, LI P, YU H X, XING L S, CAI M L, WANG H C, ZHAO M X, ZHENG J, SUN F, WANG Z Z, JIANG Z Y, OU Q J, LI S B, QU L, ZHANG Q L, ZHENG Y P, QIAO X, XI Y, ZHANG Y, JIANG F, HUANG C, LIU C H, REN Y W, WANG S, LIU H W,

GUO J Y, WANG H H, DONG H, PENG C L, QIAN W Q, FAN W, WAN F H, 2020. *Mikania micrantha* genome provides insights into the molecular mechanism of rapid growth. *Nature Communications*, 11(1): 340.

- MACANAWAI A R, APAITIA R, DAY M D, ADKINS S W, 2015. Effects of age, length, and pattern of burial on survival of *Mikania micrantha* stem sections. *Pacific Science*, 69(1): 95-102.
- MAO Y B, CAI W J, WANG J W, HONG G J, TAO X Y, WANG L J, HUANG Y P, CHEN X Y, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.
- MAI J T, LIAO L L, LING R S, GUO X L, LIN J Y, MO B X, CHEN W Z, YU Y, 2021. Study on RNAi-based herbicide for Mikania micrantha. Synthetic and Systems Biotechnology, 6: 437–445.
- PALLI S R, 2014. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, 6: 1–8.
- REDDY K R K, MAMTA N, RAJAM M V, 2016. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, 90(3): 281–292.
- RAHMANI S, BANDANI A R, 2021. A gene silencing of V-ATPase subunit a interferes with survival and development of the tomato leafminer, *Tuta absoluta. Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 106(1): 9.
- WHANGBO J S, HUNTER C P, 2008. Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6): 297–305.
- ZHENG Y, HU Y S, YAN S, ZHOU H, SONG D L, YIN M Z, SHEN J, 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAiinduced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Management Science*, 75(7): 1993-1999

(责任编辑:郭莹)