

苦荞 *FtEIN3* 基因的克隆及其抗立枯病功能分析

李光胜^{1,2}, 卢翔², 刘洋², 张凯旋², 王海华¹, 唐新科¹, 周美亮²

(¹湖南科技大学生命科学与健康学院, 湘潭 411201; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 为了了解苦荞抗立枯病的分子机制, 以苦荞代表性品种川荞1号为材料, 克隆出 *FtEIN3* 基因。生物信息学分析表明, *FtEIN3* 基因的 CDS 序列长度为 1623 bp, 编码 540 个氨基酸, *FtEIN3* 蛋白二级结构由 α -螺旋(33.52%)、延伸链(6.67%)、 β 折叠(2.41%)和无规则卷曲(57.41%)组成。系统进化树显示, 苦荞 *FtEIN3* 蛋白与棉花 *GhEIN3*、榴莲 *DzEIN3* 蛋白亲缘关系较近。通过对 108 份苦荞种质资源 *EIN3* 编码区序列比对, 检测到 5 种不同的单倍型, 其中 Hap3 为优异单倍型。qRT-PCR 结果表明, *FtEIN3* 基因在苦荞中的表达受立枯丝核菌感染的诱导。激光共聚焦显微镜观察下, 苦荞 *FtEIN3* 基因定位在细胞核上。为进一步验证 *FtEIN3* 基因的功能, 本研究构建了 *FtEIN3* 的转基因拟南芥并分析其抗病性。结果显示, 相对于野生型拟南芥, 过表达 *FtEIN3* 基因显著提高了转基因拟南芥株系的抗立枯病能力。以上结果表明 *FtEIN3* 基因参与苦荞抗立枯病的防御过程, 为进一步研究 *FtEIN3* 调控苦荞抗立枯病的分子机制奠定了一定的工作基础。

关键词: 苦荞; *FtEIN3*; 克隆; 拟南芥; 抗立枯病

Cloning and Functional Analysis of the *FtEIN3* Gene in Tartary Buckwheat Against Bacterial Blight

LI Guangsheng^{1,2}, LU Xiang², LIU Yang², ZHANG Kaixuan², WANG Haihua¹, TANG Xinke¹, ZHOU Meiliang²

(¹College of Life Science and Health, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In order to understand the molecular mechanism of tartary buckwheat against bacterial blight, we isolated the transcription factor gene *FtEIN3* in Chuanqiao 1, a representative variety of tartary buckwheat. The *FtEIN3* contains the CDS sequence length of 1623 bp, encoding 540 amino acids. The secondary structure of *FtEIN3* protein was composed of α -helix (33.52%), extended chain (6.67%), β -fold (2.41%) and irregular coil (57.41%). Phylogenetic tree indicated that *FtEIN3* protein was closely related to *GhEIN3* and *DzEIN3* protein. Five different *EIN3* sequence haplotypes were detected in 108 tartary buckwheat germplasm, and out of them Hap3 was an elite haplotype. qRT-PCR revealed that the expression of *FtEIN3* gene in tartary buckwheat was induced by *Rhizoctonia solani*. The *FtEIN3* gene in tartary buckwheat was localized in the nucleus under confocal laser microscopy. To further verify the function of *FtEIN3* gene, *FtEIN3* transgenic *Arabidopsis thaliana* were constructed and their resistance to blip disease was analyzed. The results showed that overexpression of *FtEIN3* gene significantly improved the resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana* to bacterial blight compared with the wild type. These results proved that *FtEIN3* gene was involved in the defense process of tartary buckwheat against bacterial blight, and laid a foundation for further research on the molecular mechanism of *FtEIN3* regulation of tartary buckwheat resistance to blight.

Key words: tartary buckwheat; *FtEIN3*; cloning; *Arabidopsis thaliana*; resistance to blight

收稿日期: 2023-02-22 修回日期: 2023-03-22 网络出版日期: 2023-04-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230222002>

第一作者研究方向为荞麦品质抗逆研究, E-mail: 2621739527@qq.com

通信作者: 周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与产量品质研究, E-mail: zhumeiliang@caas.cn;

唐新科, 研究方向为荞麦抗病及化感作用机制研究, E-mail: xinketang@126.com

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1001300, 2019YFD1001303)

Foundation project: National Key R&D Program of China(2019YFD1001300, 2019YFD1001303)

苦荞(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) 属蓼科荞麦属, 是一种营养均衡且富含类黄酮的作物^[1]。苦荞营养丰富, 具有消炎、杀菌、抗氧化等功能, 是一种重要的“药食两用”作物^[2]。目前人们健康观念加强, 越来越多人认识到苦荞的营养价值及重要性^[3], 由苦荞作为原料的食品也被广泛定义为健康主食^[4]。近年来, 苦荞种植面积逐步扩增, 苦荞病害的发生却极大破坏了苦荞的质量和产量^[5]。在我国昆明、贵阳、通辽、凉山等多个荞麦产区, 苦荞立枯病的发生较为严重^[6]。

苦荞立枯病由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 引起^[6]。目前, 防治苦荞立枯病一般选用抗病品种为基础, 以生物防治为主, 化学药剂为辅^[7], 然而苦荞病害方面缺乏系统而深入的研究^[7-8]。抗病基因的择取在植物抗病性的遗传改良中具有应用潜力^[9]。激素在植物抗病和防御体系中起着重要作用, 通过研究激素调控网络可预测关键抗病基因^[10]。基因家族的生物信息学分析有利于证明抗病基因在抗病和抗逆中的作用^[11], 苦荞立枯病的发生与自身抗病基因也密切相关。

Ethylene-insensitive3 (EIN3) 转录因子在植物乙烯信号途径中扮演了重要的角色^[12]。高等植物中, EIN3 转录因子存在于细胞核, 激活乙烯信号途径下游的乙烯响应基因, 以启动乙烯信号转导^[13]。拟南芥中 *AtMYC2* 和 *AtEIN3* 基因共同参与损伤反应以及调节防御基因表达^[14]。此外, *EIN3* 基因还可以增强植物的耐盐性^[15]。因此, 本研究从苦荞中克隆 *FtEIN3* 基因, 进行了一系列功能分析, 最后将 *FtEIN3* 过表达至拟南芥, 分析了转基因植株的抗病性, 为进一步研究抗病基因调控苦荞抗立枯病的分子机制奠定了一定的工作基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料选择川荞1号, 该品种在苦荞麦中具有通用性和代表性。选取饱满、大小均匀的苦荞种子, 剥去种皮, 用75%乙醇消毒10 min, 然后用无水乙醇消毒10 min, 在超净工作台里晾干。将种子接种在MS固体培养基上, 于22℃、16 h光照/8 h黑暗循环、湿度75%~80%的温室中培养。

立枯丝核菌菌株(*RS*, *Rhizoctonia solani*)、大肠杆菌菌株DH5 α 、转化农杆菌菌株GV3101、植物过表达载体 pCAMBIA1307、亚细胞定位载体 pCAMBIA1302-GFP、细胞核 maker 载体 p2300

(p2300-35S-H2B-mCherry-OCS) 均由中国农业科学院荞麦基因资源创新研究组提供。

1.2 苦荞总RNA的提取及cDNA的合成

取苦荞幼苗100 mg左右, 按照植物组织RNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司, 中国北京)说明书提取苦荞总RNA。测定RNA的OD_{260/280}值, 用1.2%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行检测后, 对检测合格的RNA进行反转录得到cDNA, 将cDNA保存于-20℃冰箱。

1.3 苦荞*FtEIN3*基因的克隆与生物信息学分析

利用Primer 5设计*FtEIN3*基因全长扩增引物对*FtEIN3*-F/R(表1), 以反转录后的cDNA为模板进行PCR反应扩增。PCR反应总体系为50 μ L: 2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L、正反向引物各2 μ L、cDNA模板200 ng、ddH₂O补充至50 μ L。反应条件为94℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 55℃退火60 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 最后72℃延伸7 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收纯化。纯化产物连接至pTOPO-Blunt Simple Vector并转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑选单菌落, 经菌液PCR鉴定后送公司进行测序, 得到*FtEIN3*-T载体的质粒。

对测序得到的正确序列进行生物信息学分析, 应用PSIPRED Workbench (ucl.ac.uk)、SWISS-MODEL Interactive Workspace (expasy.org) 网站对*FtEIN3*蛋白二级结构和三级结构进行预测, 利用Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对基因启动子序列进行分析; 再通过NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中BLASTP搜索与该基因同源性较高的序列, 并利用MEGAX软件构建进化树。

1.4 *FtEIN3*基因在苦荞材料中的多样性分析

通过分析课题组前期重测序工作所建立的数据库(未发表), 选择108份苦荞材料对苦荞*FtEIN3*基因(苦荞数据登录号: FtPinG0707941400.01)进行单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)分析, 其由7份喜马拉雅野生群体、78份北方群体和23份南方群体组成。

1.5 立枯丝核菌的培养和活化

1.5.1 PDB培养基的制备 称取马铃薯葡萄糖液体培养基Potato Dextrose Broth(PDB)(北京酷来博科技有限公司, 中国北京)粉末26 g于蒸馏水中充分溶解, 定容至1 L, 摇匀后分装到250 mL锥形瓶中, 封口, 121℃高压灭菌20 min, 4℃冰箱中保存备用。

表 1 引物序列汇总

Table 1 Summary of primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Function
<i>FtEIN3</i> -F	ATGTCAGGGATGAACTTTTCG	基因克隆
<i>FtEIN3</i> -R	TTAAATGAACCAAACAGAAGAATCC	
<i>FtEIN3</i> -qPCR-F	TCGGCTTGGGTTTATC	qRT-PCR
<i>FtEIN3</i> -qPCR-R	TAAGGGAAGTGGTAGTTTG	
<i>FtH3</i> -qPCR-F	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	qRT-PCR 苦荞内参基因
<i>FtH3</i> -qPCR-R	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
1302- <i>FtEIN3</i> -F	ACGGGGGACTCTTGACCATGGTAATGTCAGGGATGAACTTTTCGA	构建亚细胞定位载体
1302- <i>FtEIN3</i> -R	AAGTTCTTCTCCTTTACTAGTAATGAACCAAACAGAAGAATCCT	
1302-F	GCCCAGCTATCTGTCACTTTATTG	1302通用引物
1302-R	TAAGAGAAAGTAGTGACAAGTG	
1307- <i>FtEIN3</i> -F	GACTTGAACCTCGGTATCTAGAATGTCAGGGATGAACTTTTCGA	构建过表达载体
1307- <i>FtEIN3</i> -R	CTTGATATCGAATTCCTGCAGTTAAATGAACCAAACAGAAGAATCCT	
TLF	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	1307通用引物
1307-R	TATCTGGGAAGTACTCACACATTA	
<i>Actin7</i> -F	TCCATGAAACAACCTTACAACCTCCATCA	qRT-PCR 拟南芥内参基因
<i>Actin7</i> -R	CATCGTACTCACTCTTTGAAATCCACA	

1.5.2 PDA 培养基的制备 称取马铃薯葡萄糖琼脂培养基 Potato Dextrose Agar (PDA) (北京酷来博科技有限公司, 中国北京) 粉末 11.5 g 于蒸馏水中, 充分溶解后定容至 250 mL, 高压灭菌锅灭菌, 倒板, 每板 25 mL 左右, 待凝固后 4 °C 保存备用。

1.5.3 菌株的活化 将立枯丝核菌接种于 PDA 上, 置于 28 °C 恒温培养箱中活化, 暗培养 3~5 d, 得到立枯丝核菌菌株。取 PDA 上 2 块长势一致的立枯丝核菌菌株分别接种于 PDB 中, 28 °C 恒温摇床暗培养 2~3 d, 过滤, 得到立枯丝核菌菌液。

1.6 *FtEIN3* 的表达分析

1.6.1 苦荞 *FtEIN3* 基因的表达分析 选取生长 15 d 的长势良好的苦荞麦川荞 1 号无菌苗, 用立枯丝核菌菌液侵染, 于 28 °C 恒温培养箱培养, 待侵染 0、6、12、24、48 h 时取样, 提取样品的叶、茎、根组织中的总 RNA, 测定 *FtEIN3* 基因在苦荞不同组织中的相对表达量。

将 *FtEIN3* 转基因拟南芥 OE3 株系和野生型拟南芥在同一条件下正常培养 25 d。4 株拟南芥为一组, 种在同一盆内, 选取 3 组拟南芥进行立枯丝核菌侵染, 每 3 组分别侵染 0、6、12、24、48 h。提取野生型拟南芥和 OE3 各个侵染时间段的 RNA, 反转录得到 cDNA。采用 qRT-PCR 方法检测野生型拟南芥和

OE3 在不同侵染时间段下的表达模式。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 根据 *FtEIN3* 基因的非保守区间, 设计荧光定量引物对 *FtEIN3*-qPCR-F/R (表 1)。荞麦组成型表达基因 *FtH3* 作为内参基因, 引物名称为 *FtH3*-qPCR-F/R (表 1)。采用南京诺唯赞生物技术有限公司 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒和 7500 Real Time PCR System 仪器进行 qRT-PCR 检测和分析。相对表达量计算使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

1.7 转基因拟南芥的构建

1.7.1 pCAMBIA1307-*FtEIN3* 过表达载体的构建 根据基因克隆测序结果正确的 *FtEIN3* 序列和过表达载体 pCAMBIA1307 图谱设计引物对 1307-*FtEIN3*-F/R, 以 *FtEIN3*-T 质粒为模板, 进行 PCR 扩增反应; 同时, 用限制性内切酶 *Xba* I、*Pst* I 酶切 pCAMBIA1307 载体。两者均用琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化回收, 再进行同源重组连接, 然后转化于 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆菌落, 经菌液 PCR 检测及测序结果比对正确, 即得到过表达载体 pCAMBIA1307-*FtEIN3* (简称 1307-*FtEIN3*)。同理也得到亚细胞定位载体 pCAMBIA1302-GFP-*FtEIN3* (简称 1302-*FtEIN3*)。

1.7.2 转化农杆菌 GV3101 及侵染拟南芥 pCAM

BIA1307-*FtEIN3*重组质粒转化至农杆菌GV3101感受态细胞中,挑取单克隆菌落,筛选鉴定得到阳性克隆。将阳性菌液摇至吸光度 OD_{600} 到0.6~0.8,使用蘸花法对野生型拟南芥进行侵染试验。收取转基因植株 T_0 种子,使用潮霉素抗性MS固体培养基筛选获得 T_1 转基因拟南芥。提取 T_1 幼苗叶片基因组DNA为模板,以pCAMBIA1307载体通用引物TLF作为正向引物,基因特异性引物1307-*FtEIN3*-R为反向引物进行PCR反应,检测后获得单株阳性过表达拟南芥植株(OE, overexpression)。

1.8 *FtEIN3*的亚细胞定位

应用多个亚细胞定位预测网站(<https://wolfsort.hgc.jp>、<http://cello.life.nctu.edu.tw>、<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2>、<http://linux1.softcn/bioinf/Cell-PLoc-2>、<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&subgroup=proloc>)预测*FtEIN3*基因的亚细胞定位。

播撒烟草种子于营养土中,温室培养25~30 d。将细胞核标记载体p2300(全称为p2300-35S-H2B-mCherry-OCS)、1302空载体(全称为pCAMBIA1302-GFP)和1302-*FtEIN3*转化至农杆菌GV3101,PCR鉴定为阳性后,接种于10 mL培养基中,摇至 OD_{600} 值为0.6~0.8,8000 rpm,离心5 min集菌,用重悬液重悬菌体(重悬液配方(现用现配)为1 mol/L $MgCl_2$ 1 mL、0.2 mol/L MES 5 mL、100 μ mol/L 乙酰丁香酮 100 μ L、ddH₂O定容至100 mL)。挑选生长状况良好的本氏烟草叶片,用去针头的注射器从下表皮注射,并做好标记。将注射好的植株暗培养12 h,再正常培养12~24 h,将叶片制成玻片并于激光共聚焦显微镜(ZEISS, LSM 900)观察拍照。

1.9 转基因拟南芥株系抗病性的鉴定

将转基因拟南芥株系和野生型拟南芥种子经消毒晾干后点播在MS固体培养基上。将生长7 d的幼苗转到蛭石:营养土为1:1的培养盆中,16 h光照/8 h黑暗,22 $^{\circ}C$ 培养3周。为了鉴定*FtEIN3*过表达转基因株系的抗病性,用立枯丝核菌侵染转基因株系和野生型拟南芥的离体叶片:在培养皿中放置滤纸,用水润湿,以保持叶片湿度,取叶片置于滤纸上,50%叶片用病菌侵染,50%叶片不做处理,注意分开已侵染与未侵染的培养皿,用保鲜膜封住,放置于28 $^{\circ}C$ 培养箱暗培养,24 h后观察其病害情况。进一步做二氨基联苯胺(DAB, diaminobenzidine)染色试验以观察病斑情况。在野生型拟南芥和*FtEIN3*转基因拟南芥正常发育到苗期时,为了研

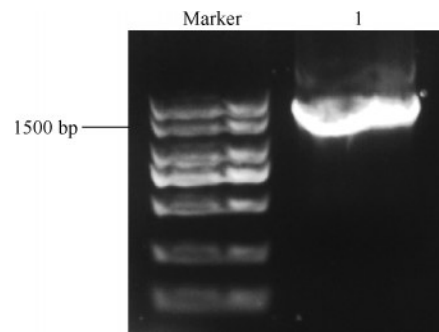
究其体内超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)和丙二醛(MDA, malondialdehyde)的活性变化,对野生型拟南芥和转基因拟南芥均进行立枯丝核菌侵染处理,不侵染的为对照组。24 h后,取样进行活性检测。

运用Excel软件和Origin 2019b 64Bit等生物信息学软件对数据进行计算、处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 苦荞抗病基因*FtEIN3*的序列扩增与生物信息学分析

提取川荞1号幼苗的RNA,经反转录得到cDNA。以该cDNA为模板进行PCR扩增,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测。如图1显示,目的基因条带大小在1500~2000 bp之间,与*FtEIN3*基因大小一致。



Maker: DL2000 maker; 1: *FtEIN3*基因的PCR扩增目的条带
Maker: DL2000 marker; 1: The PCR amplification target band of *FtEIN3* gene

图1 苦荞*FtEIN3*基因CDS序列扩增

Fig.1 CDS sequence amplification of *FtEIN3* in tartary buckwheat

生物信息学分析表明,*FtEIN3*基因的CDS序列长度为1623 bp,编码540个氨基酸。应用ExPASy网站对其蛋白性质进行分析,结果表明,*FtEIN3*蛋白的理论相对分子质量为61.10 kDa,理论等电点为5.87,预测的分子式为 $C_{2687}H_{4175}N_{751}O_{834}S_{31}$,不稳定指数为 $56.84 > 40$,亲水性平均值为-0.774(负值代表亲水),由此表明*FtEIN3*蛋白是不稳定的亲水性蛋白。

*FtEIN3*蛋白二级结构(图2A)由 α -螺旋(33.52%)、延伸链(6.67%)、 β 折叠(2.41%)和无规则卷曲(57.41%)组成。对其三级结构模型进行作图,结果与二级结构一致(图2B)。

应用PlantCare网站对*FtEIN3*基因进行启动子

区分析,发现 *FtEIN3* 基因启动子中存在大量 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件,除此之外,还包含一系列顺式作用元件,包括病原菌诱导响应元件 W-box、低温响应元件 LTR、MeJA 反应响应元件

CGTCA-motif 和 TGACG-motif、厌氧诱导响应元件 ARE 等(表 2)。这些顺式作用元件预示了 *FtEIN3* 基因可能会参与苦荞的各种调控途径,以及对生物与非生物的胁迫响应。

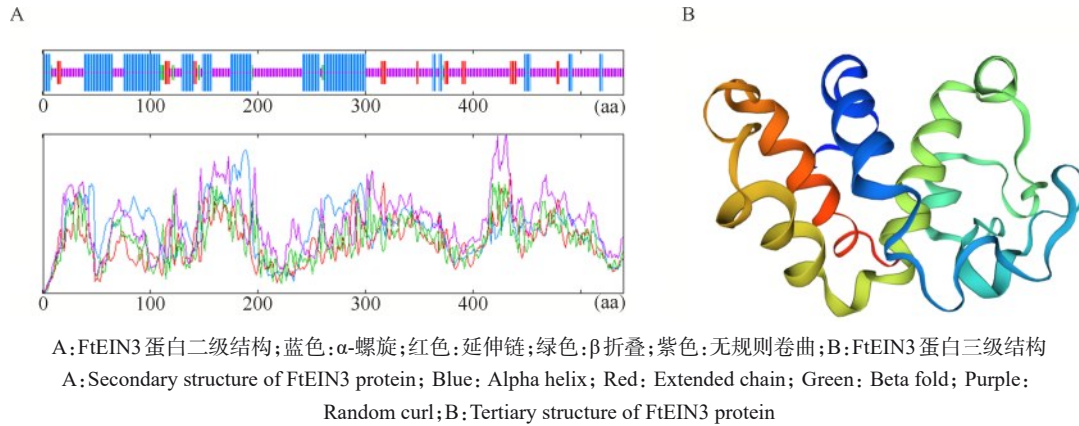


图 2 *FtEIN3* 蛋白的二级结构和三级结构预测

Fig.2 Secondary structure and tertiary structure prediction of FtEIN3 protein

表 2 *FtEIN3* 基因启动子序列中的顺式作用元件

Table 2 Cis-acting elements in *FtEIN3* gene promoter sequence

元件名称	序列	数目	功能
Cis-acting elements	Sequence	Number	Function
TATA-box	TATA	3	TATA 框, 转录起始必须元件
	TACAAAA	1	
	ATTATA	1	
	TATAA	1	
CAAT-box	CAAT	17	CAAT 框, 转录增强元件
	CCAAT	2	
	CAAAT	5	
W-box	TTGACC	1	病原菌诱导响应元件
LTR	CCGAAA	2	低温响应元件
CGTCA-motif	CGTCA	1	MeJA 反应响应元件
ARE	AAACCA	1	厌氧诱导响应元件
MYC	CATGTG	3	逆境胁迫响应元件
	CATTTG	2	
	TCTCTTA	2	
MYB	CAACCA	1	逆境胁迫响应元件
	CAACAG	1	
GARE-motif	TCTGTTG	1	赤霉素反应响应元件
I-box	CGATAAGGCG	1	光照响应元件
TGACG-motif	THACG	1	MeJA 反应响应元件

2.2 *FtEIN3* 蛋白同源比对与进化树分析

通过 NCBI 在线网站将 *FtEIN3* 蛋白序列与不同物种进行比对, 得到拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、日本晴水稻 (*Oryza sativa Japonica Group*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、榴莲 (*Durio zibethinus*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、

玉米 (*Zea mays*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、木薯 (*Manihot esculenta*)、茶树 (*Camellia sinensis*) 的蛋白序列。利用 MEGA6.0 软件构建系统进化树(图 3), 结果表明, 苦荞 *FtEIN3* 与棉花 *GhEIN3*、榴莲 *DzEIN3* 亲缘关系较近。

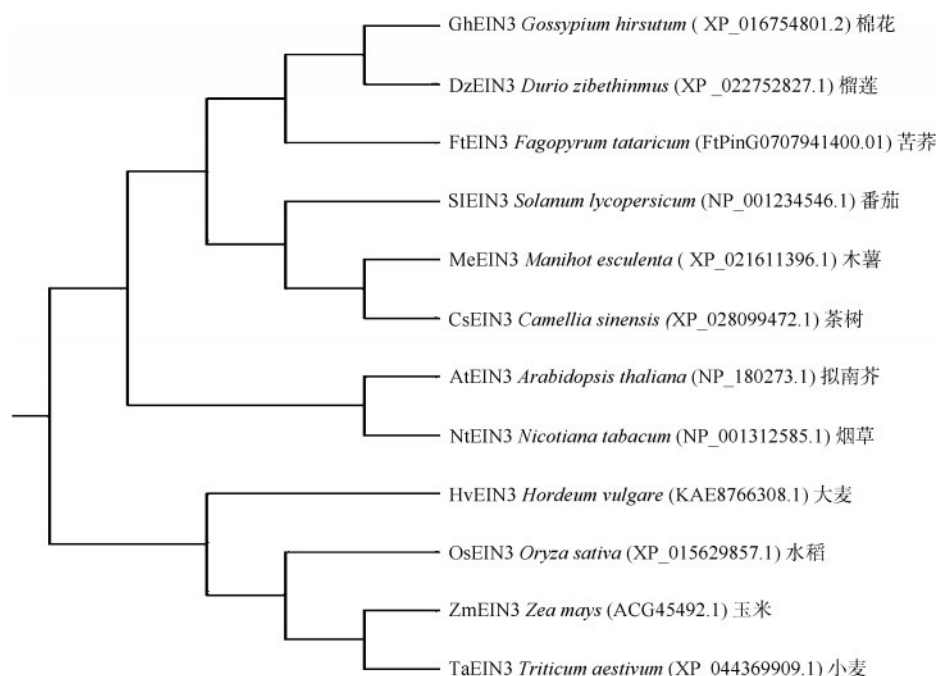
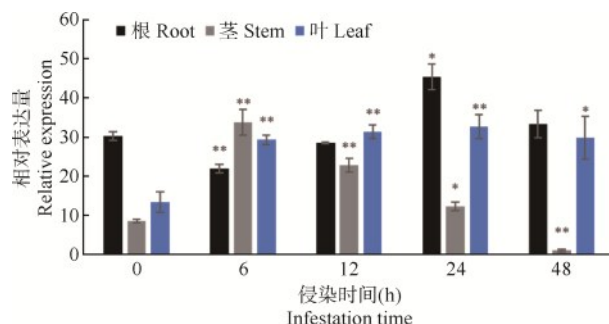


图3 FtEIN3及其同源蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of FtEIN3 and its homologous proteins

2.3 立枯丝核菌处理下苦荞中 *FtEIN3* 基因的表达
采用 qRT-PCR 的方法检测 *FtEIN3* 在立枯丝核菌感染条件下的响应模式(图4)。结果表明,苦荞 *FtEIN3* 基因受立枯丝核菌胁迫而诱导表达。



*表示在0.05水平上有显著性差异;**表示在0.01水平上有显著性差异;下同

* indicates significant difference at the 0.05 level; ** indicates significant difference at the 0.01 level; The same as below

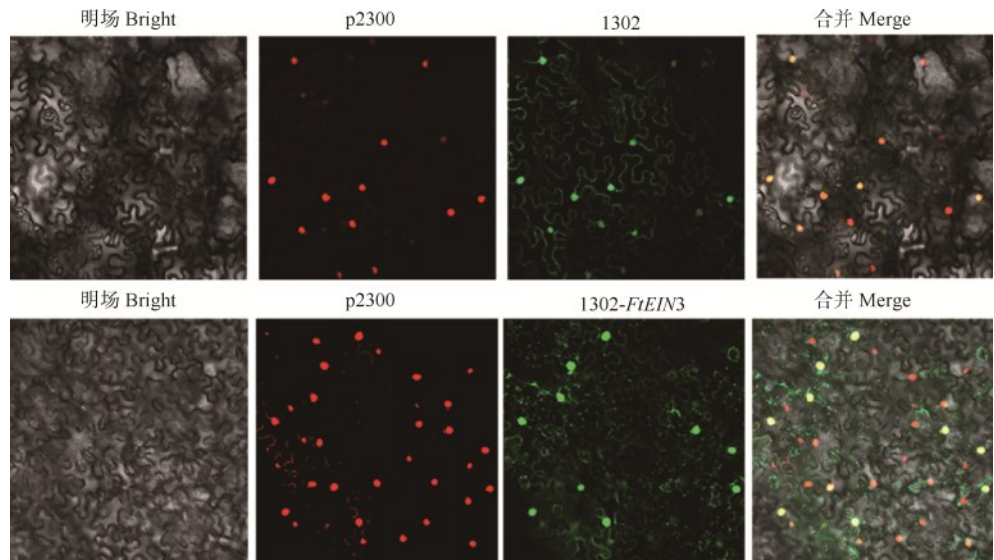
图4 苦荞在立枯丝核菌感染条件下 *FtEIN3* 的相对表达量
Fig.4 Relative expression of *FtEIN3* in tartary buckwheat infected by *Rhizoctonia solani*

FtEIN3 基因在苦荞幼苗的根、茎、叶中均有不同的表达模式。立枯丝核菌菌液处理达到6 h时, *FtEIN3* 基因在茎和叶中的表达量均高于根的表达量;而在24 h时,根的表达量达到最高。随着立枯丝核菌感染时间的增长, *FtEIN3* 基因在不同组织中的表达量也随之变化。在根中,0~6 h

期间 *FtEIN3* 基因表达下调,在6~24 h期间表达上升后又在48 h时降低;在茎中,0~6 h期间 *FtEIN3* 基因表达量显著上升,而在6~48 h期间持续降低;在叶中,0~6 h *FtEIN3* 基因表达量显著上升,6~48 h表达趋势基本不变。在立枯丝核菌感染期间,根、茎、叶中的 *FtEIN3* 基因表达量均有不同的变化。由此可推测,在立枯丝核菌感染苦荞幼苗时,苦荞 *FtEIN3* 基因受到胁迫而诱导表达。在一定时间内, *FtEIN3* 基因表达上调,随着立枯丝核菌侵入时间增长,苦荞幼苗体内可能发生了其他生理反应导致 *FtEIN3* 基因表达的下调,且植物不同组织对于立枯丝核菌的胁迫响应也不完全相同。

2.4 苦荞 *FtEIN3* 基因的亚细胞定位

多个亚细胞定位预测网站预测结果均表示 *FtEIN3* 基因可能定位在细胞核上。将构建好的亚细胞定位融合载体 1302-*FtEIN3* 细胞核标记载体 p2300 采用农杆菌介导法通过注射使其瞬时共转化到本氏烟草叶片背面,采用空载体 1302 作为对照组,用激光共聚焦显微镜观察。结果显示:对照组空载体 1302 荧光信号定位在细胞膜和细胞核上,试验组 1302-*FtEIN3* 荧光信号定位于细胞核上(图5)。由此表明,苦荞 *FtEIN3* 基因定位在细胞核上,与预测结果一致。



p2300: 细胞核标记载体; 1302: 亚细胞定位空载体; 1302- *FtEIN3*: 含有目的基因的亚细胞定位融合载体
 p2300: Nuclear maker vector; 1302: Subcellular localization of empty vectors; 1302- *FtEIN3*: Subcellular localization of fusion vectors containing target gene

图5 苦荞 *FtEIN3* 基因的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of *FtEIN3* in Tartary buckwheat

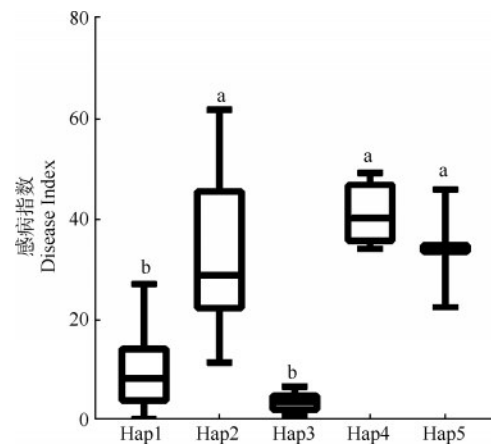
2.5 *FtEIN3* 基因的多样性分析

FtEIN3 基因在苦荞麦 7 号染色体编码区存在 5 个 SNP 位点 45303553、45303556、45303724、45303860、45303876, 对其进行简单分析, 结果详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230222002>, 附表 1, 5 个位点的多样性表现为 45303553 (T/A)、45303556 (A/G)、45303724 (C/T)、45303860 (A/G)、45303876 (A/G), 说明 *FtEIN3* 基因存在多样性。*FtEIN3* 基因在 108 个苦荞品种中有 5 种单倍型: Hap1~Hap5, 其中, Hap1 包含的苦荞种质资源最多, 为 64 个 (详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230222002>, 附表 1)。图 6 所示, 感病指数越高, 说明该品种越易感病。Hap3 感病指数最低, 为优异单倍型, 包含 8 份苦荞种质资源 (JX252、JPN333、GZ414、SC213、GZ253、SX-342、sx137、HB58)。推测这 8 份苦荞种质资源可能具有更高的抗病性。

2.6 异源转化拟南芥验证基因 *FtEIN3* 的功能

2.6.1 *FtEIN3* 转基因拟南芥植株的获得及鉴定

图 7A 所示, *FtEIN3* 转基因拟南芥的条带单一且与 1307-*FtEIN3* 重组质粒大小一致。提取野生型拟南芥与 *FtEIN3* 转基因拟南芥的 RNA, 反转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR, 结果表明 (图 7B), *FtEIN3* 在 3 个转基因拟南芥株系中确实超表达, 有显著差异。综上, 成功获得 *FtEIN3* 转基因拟南芥植株, 可获取纯合后代, 单株收取以进行后续试验。



Hap1~Hap5: 分别表示 5 种不同的单倍型;
 不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$)

Hap-Hap5: Respectively represent 5 different haplotypes;
 Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图6 苦荞 *FtEIN3* 基因不同单倍型分析
 Fig.6 Different haploid analysis of *FtEIN3* in tartary buckwheat

2.6.2 *FtEIN3* 转基因拟南芥的抗病性鉴定

2.6.2.1 转基因拟南芥离体叶片侵染试验

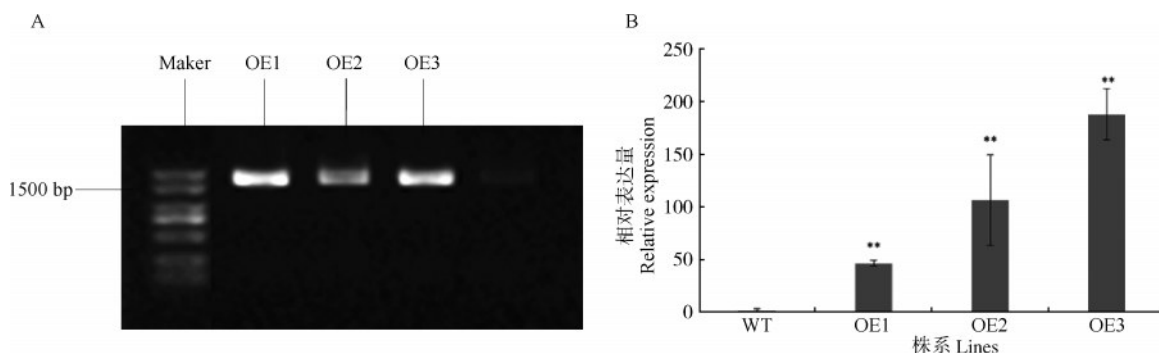
将野生型拟南芥与 *FtEIN3* 转基因拟南芥正常培育 3 周, 分别取大小相近的叶片作为两组。试验组用于立枯丝核菌离体侵染, 对照组不做处理。如图 8 所示, 24 h 后, 对照组的转基因株系与野生型拟南芥没有任何差别; 试验组野生型拟南芥离体叶片上病斑面积明显大于另外 3 个转基因株系。因此, 在立枯丝核菌侵染条件下, *FtEIN3* 转基因拟南芥株系的离体叶片对于立枯病的抗病性明显高于野生型拟

南芥。

2.6.2.2 DAB染色试验 选取野生型拟南芥和 *FtEIN3*转基因拟南芥的离体叶片,一组进行立枯丝核菌侵染处理,一组不做处理。28℃培养箱处理24h后,用DAB染色液对离体叶片染色20min,再用叶绿体脱色液脱色3次以上至叶片无色。如图9所示,试验组被立枯丝核菌侵染的叶片均有明显病斑,呈棕褐色,对照组则无明显差别,且 *FtEIN3*转基因拟南芥株系离体叶片上的病斑面积明显小于野生型拟南芥,说明在立枯丝核菌侵染24h之内, *FtEIN3*转基因拟南芥

离体叶片的抗病性显著强于野生型。

2.6.3 立枯丝核菌侵染 *FtEIN3*转基因拟南芥的表达模式 如图10所示,野生型拟南芥和OE3随着立枯丝核菌侵染时间的增加, *FtEIN3*基因相对表达量也逐渐升高。在24h时,OE3中相对表达量达到野生型拟南芥的3.5倍,48h达到野生型拟南芥的3.2倍。综上,在立枯丝核菌侵染拟南芥时,相对于野生型拟南芥,转基因拟南芥OE3株系中的 *FtEIN3*基因相对表达量显著提高。



Maker: DL2000 maker; WT: 野生型拟南芥; OE1~OE3: 转基因拟南芥阳性株系; 下同

Maker: DL2000 maker; WT: Wild type *Arabidopsis thaliana*; OE1-OE3: Overexpression *Arabidopsis thaliana* positive lines; The same as below

图7 *FtEIN3*转基因拟南芥阳性株系的鉴定(A)和表达分析(B)

Fig.7 Identification of positive lines(A) and expression analysis(B) in *FtEIN3* overexpression(OE) *Arabidopsis Thaliana* lines

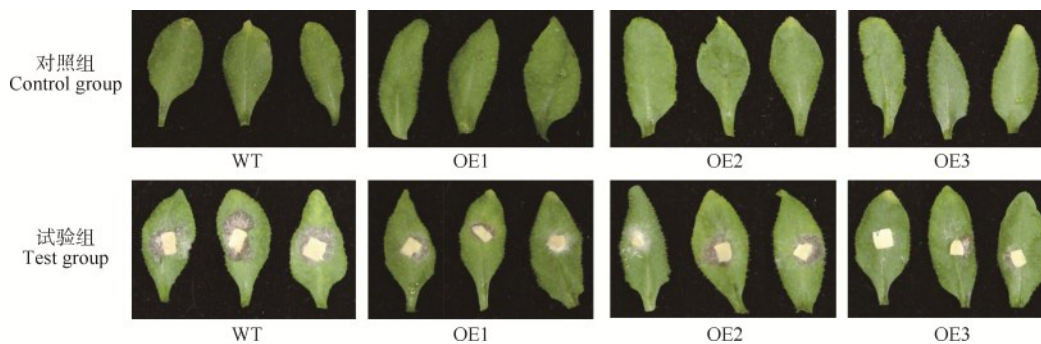


图8 *FtEIN3*转基因拟南芥的抗病性表型验证

Fig.8 Phenotypic validation of disease resistance in *FtEIN3* transgenic *Arabidopsis thaliana*

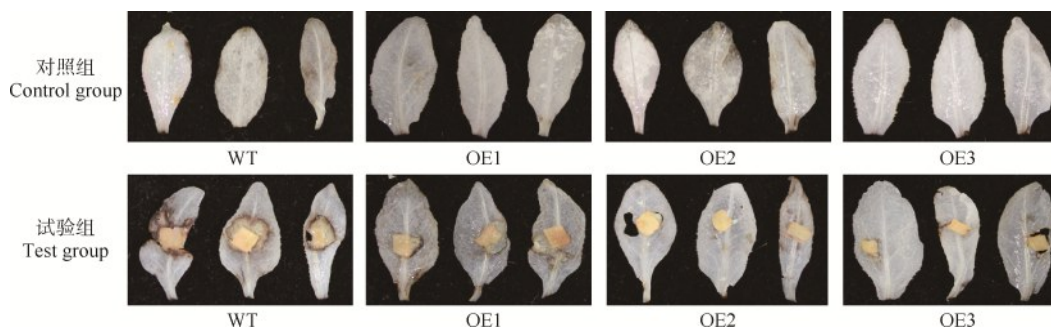


图9 *FtEIN3*转基因拟南芥的抗病性DAB染色验证

Fig.9 DAB staining verification of disease resistance in *FtEIN3* transgenic *Arabidopsis thaliana*

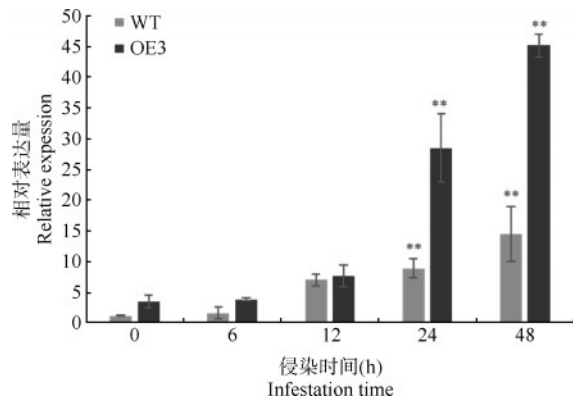


图 10 立枯丝核菌侵染 WT 和 OE3 时 *FtEIN3* 的相对表达量

Fig.10 Relative expression of *FtEIN3* in WT and OE3 infected by *Rhizoctonia solani*

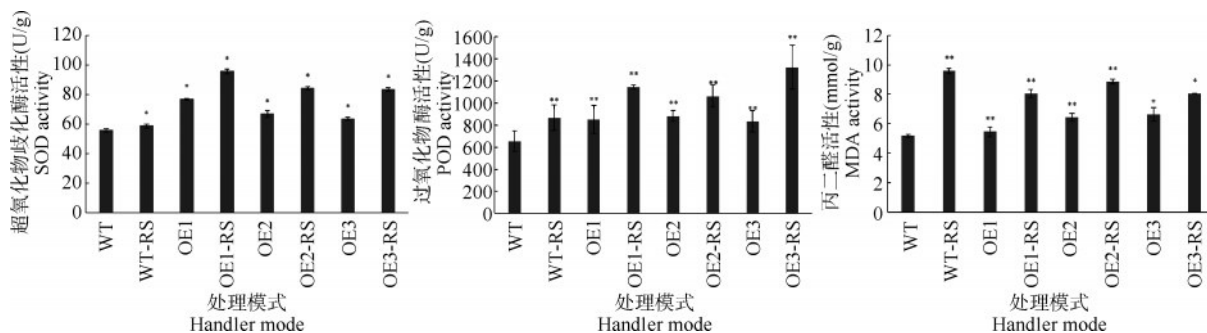
2.6.4 *FtEIN3* 转基因拟南芥抗病性相关生理生化指标分析 如图 11 所示, SOD 活性检测结果说明, 与未接种处理组相比, 野生型拟南芥被立枯丝核菌侵染 24 h 时, SOD 活性上升了 2.87 U/g; 3 个 *FtEIN3* 转基因拟南芥株系中, 在侵染 24 h 后, OE1、OE2、OE3 的 SOD 活性分别上升了 19.01 U/g、17.38 U/g、19.87 U/g, 约为野生型增长量的 6~7 倍。

POD 活性检测结果表明, 野生型拟南芥和

FtEIN3 转基因拟南芥被立枯丝核菌侵染 24h 后, POD 活性均有显著上升。与未接种处理组相比, 野生型拟南芥、OE1、OE2、OE3 的 POD 活性分别上升了 212.33 U/g、294.00 U/g、179.67 U/g、490.00 U/g, 其中 *FtEIN3* 转基因拟南芥株系 OE3 的上升幅度约为野生型的 2 倍。

MDA 活性检测结果表明, 与未接种处理组相比, 立枯丝核菌侵染野生型拟南芥 24 h, MDA 活性上升了 4.39 nmol/g; 而 *FtEIN3* 转基因拟南芥株系 OE1、OE2、OE3 在被侵染后, MDA 活性分别上升了 2.60 nmol/g、2.42 nmol/g、1.43 nmol/g, 约为野生型的 0.5 倍。

在受到立枯丝核菌侵染时, *FtEIN3* 转基因拟南芥的 SOD 和 POD 活性相较于野生型拟南芥上升幅度更大, 表明 *FtEIN3* 转基因拟南芥可能通过 SOD 和 POD 调控活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 发挥功能。MDA 活性的上升体现了细胞膜的损伤程度, 立枯丝核菌侵染拟南芥时, 野生型拟南芥体内的 MDA 活性更高, 表明野生型拟南芥细胞膜损伤程度更高, *FtEIN3* 转基因拟南芥则与之相反, 说明 *FtEIN3* 转基因拟南芥相较于野生型拟南芥细胞膜损伤更轻。



WT-RS: 被立枯丝核菌侵染 24 h 的野生型拟南芥; OE1~OE3-RS: 被立枯丝核菌侵染 24 h 的转基因拟南芥株系

WT-RS: Wild type *Arabidopsis thaliana* infected with *Rhizoctonia solani* for 24 h; OE1-OE3-RS: Overexpression *Arabidopsis thaliana* lines infected with *Rhizoctonia solani* for 24 h

图 11 *FtEIN3* 转基因拟南芥抗病性相关生理生化指标分析

Fig.11 Analysis of physiological and biochemical indexes related to disease resistance of *FtEIN3* transgenic *Arabidopsis Thaliana*

3 讨论

立枯丝核菌是广泛存在于世界各地的植物土传病原真菌, 能够感染多种作物, 引起种子腐烂、幼苗萎蔫、根腐病等, 严重危害植物的生长进而影响产量和质量^[16-17]。转录因子在作物抵御生物胁迫时发挥着重要作用, 促进植物抗逆能力^[18-19]。本研究从苦荞中克隆得到一个转录因子 *FtEIN3*, 氨基酸

序列比对发现 *FtEIN3* 与棉花 *GhEIN3*、榴莲 *DzEIN3* 亲缘关系较近, 棉花 *GhEIN3* 基因具有一定的耐盐性^[20], 且在棉花抗枯萎病的过程中起积极作用^[21]。因此推测 *FtEIN3* 基因可能参与植物的抗逆/病反应。

宁小萌等^[22]对白桦 *Trihelix* 家族进行表达模式分析, 发现 8 个家族成员基因在根、茎、叶中均有不同程度的表达, 且在立枯丝核菌感染白桦幼苗根部

24 h 时 3 个基因 (*BpTrihelix3*、*BpTrihelix4* 和 *BpTrihelix7*) 相对表达量显著上调。*FtEIN3* 在苦荞根、茎、叶中立枯丝核菌感染的各个时间点也均有表达,且在立枯丝核菌感染 6 h 时苦荞麦茎与叶中诱导程度最高,24 h 时苦荞麦根中的基因表达量达到最高。*FtEIN3* 转基因拟南芥中,*FtEIN3* 基因相对表达量随着立枯丝核菌感染时间的增加而升高。因此推测 *FtEIN3* 基因受立枯丝核菌的诱导,且基因的表达与立枯丝核菌的感染时间密切相关,从而调节植物自身抗病性。*PR1* 基因被广泛认为是防卫基因,大蒜体内的 *AsPR1* 基因表达量明显增加,是因为植物本身形成了一定的防御机制^[23],因此,推测在立枯丝核菌感染苦荞时,苦荞自身也形成了防御机制,导致 *FtEIN3* 基因表达量增加,从而提高苦荞的抗病性。转基因拟南芥中的抗病表型和 DAB 染色结果也证实了这一点。

生物多样性和单倍型分析对于优异单倍型的发掘和基因功能的研究有着重大意义^[24]。杨辉等^[25]利用 51 份不同类型水稻种质资源对 *SKC1* 基因编码区进行测序分析,共得到 9 种不同的单倍型,且 Hap2 是粳稻中的一个稀有耐盐单倍型。Liu 等^[26]利用单倍型分析鉴定出与高蔗糖合成效率潜在相关的甘蔗单倍型。Huang 等^[27]对抗病基因的研究鉴定出一种新型 Pm21 单倍型,可以限制病菌菌丝的生长,为小麦育种提供了新的基因资源。本研究中,对 108 份苦荞种质资源进行单倍型分析,检测到了 5 种不同的单倍型,其中 Hap3 为优异单倍型,可能具有更高的抗立枯病能力,为今后研究苦荞对于立枯病或其他病害的抗性提供了新的遗传资源参考价值。

进一步研究了拟南芥中 *FtEIN3* 基因的生理生化性质,在不同处理下,对野生型拟南芥和 *FtEIN3* 转基因拟南芥株系 OE1、OE2、OE3 中的 POD、SOD 和 MDA 活性进行了测定,试验结果显示,相较于野生型拟南芥,OE1、OE2、OE3 中在立枯丝核菌感染后的 SOD 活性显著增加;OE3 中的 POD 活性上升幅度也比野生型拟南芥中大。POD 和 SOD 均可以降低自由基对细胞膜的损伤^[28]。李易初等^[29]发现大豆菌核病菌致病力的强弱与 POD 和 SOD 活性相关。因此,POD 和 SOD 活性可能与立枯丝核菌致病性相关。MDA 是衡量氧化胁迫程度的常用指标之一,能反映植物膜脂过氧化程度^[30]。通过 MDA 了解膜脂过氧化程度,以间接测定膜系统受损程度以及植物的抗逆性^[31]。在病菌感染后,

野生型拟南芥中 MDA 活性相较于 OE1、OE2、OE3 升高更加显著,因此野生型拟南芥受立枯病感染更高。综上,*FtEIN3* 转基因拟南芥在受立枯丝核菌感染后,其体内 POD 和 SOD 活性增加,MDA 活性减弱,从而提高植物的抗病性。

4 结论

从苦荞中克隆得到 *FtEIN3* 基因,*FtEIN3* 基因受立枯丝核菌诱导表达,立枯丝核菌感染 24 h 时,*FtEIN3* 基因在苦荞根、茎、叶中表达量均有显著变化,且在根中的表达量最高。*FtEIN3* 基因定位在细胞核。通过对 108 份苦荞种质资源 *EIN3* 编码区进行分析,发现有 5 种不同的单倍型,其中 Hap3 为优异单倍型,包含的苦荞种质资源可能具有更高的抗病性。转基因拟南芥离体叶片感染试验和 DAB 染色试验结果说明 *FtEIN3* 基因具有一定的抗病性。在立枯丝核菌感染条件下,*FtEIN3* 转基因拟南芥体内的 POD 和 SOD 活性较野生型拟南芥显著提高,MDA 活性则显著减少,说明其抗病能力显著高于野生型拟南芥。

参考文献

- [1] Zhang K X, He M, Yu F Z, Hui G B, Yang K L, Li F L, Tang Y, Gao Q, Lin T, Quinet M, Janovská D, Meglič V, Kwiatkowski J, Romanova O, Chungoo N, Suzuki T, Luthar Z, Germ M, Woo S H, Georgiev M I, Zhou M L. Resequencing of global tartary buckwheat accessions reveals multiple domestication events and key loci associated with agronomic traits. *Genome Biology*, 2021, 22(1):23
- [2] 范昱,丁梦琦,张凯旋,杨克理,唐宇,张宗文,方洸,严俊,周美亮. 荞麦种质资源概况. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(4): 813-828
- [3] Fan Y, Ding M Q, Zhang K X, Yang K L, Tang Y, Zhang Z W, Fang W, Yan J, Zhou M L. Germplasm resource of the genus *Fagopyrum* Mill. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(4):813-828
- [4] Rabitti N S, Appiani M, Marti A, Buratti S, Benedetti S, Chiodaroli G, Proserpio C, Laureati M. Valorization of common (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and tartary (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) buckwheat in gluten-free polenta samples: Chemical-physical and sensory characterization. *Foods*, 2022, 11(21):3442
- [5] Guo Z, Wang L J, Cao R, Qiu J. Effect of frozen treatment on the sensory and functional quality of extruded fresh noodles made from whole tartary buckwheat. *Foods*, 2022, 11(24): 3989
- [6] Liu X J, Zhou S B, Chen S X, Yi Z L, Pan H Y, Yao R. Buckwheat disease recognition based on convolution neural

- network. *Applied Sciences*, 2022, 12(9):4795
- [6] 赵江林, 江兰, 钟灵允, 谭茂玲, 赵钢. 荞麦立枯病病原菌的分离与鉴定//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2018 年学术年会论文集. 北京: 中国植物病理学会, 2018: 33
Zhao J L, Jiang L, Zhong L Y, Tan M L, Zhao G. Isolation and identification of pathogenic bacteria from buckwheat blight// Chinese Society of Plant Pathology. Proceedings of 2018 annual conference of chinese society of plant pathology. Beijing: Chinese Society of Plant Pathology, 2018: 33
- [7] 齐杨菊, 陈振江, 李振霞, 刘辉, 王莉花, 李春杰. 荞麦病害研究进展. *草业科学*, 2020, 37(1): 75-86
Qi Y G, Chen Z J, Li Z X, Liu H, Wang L H, Li C J. Research progress of buckwheat diseases. *Pratacultural Science*, 2020, 37(1): 75-86
- [8] 孔德章, 韦启迪. 荞麦病虫害及防治的研究进展. *农技服务*, 2020, 37(7): 27-31
Kong D Z, Wei Q D. Research progress of buckwheat pests and their control. *Agricultural Technology Services*, 2020, 37(7): 27-31
- [9] Lu Y D, Zhong Q F, Xiao S Q, Wang B, Ke X, Zhang Y, Yin F Y, Zhang D Y, Jiang C, Liu L, Li J L, Yu T Q, Wang L X, Cheng Z Q, Chen L. A new NLR disease resistance gene *Xa47* confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 901
- [10] Yan W Y, Jian Y Q, Duan S G, Guo X, Hu J, Yang X H, Li G C. Dissection of the plant hormone signal transduction network in late blight resistant potato genotype SD20 and prediction of key resistance genes. *Phytopathology*, 2022: 1-13
- [11] Cantila A Y, Thomas W J W, Bayer P E, Edwards D, Batley J. Predicting cloned disease resistance gene homologs (CDRHs) in radish, underutilised oilseeds, and wild brassicaceae species. *Plants*, 2022, 11(22): 3010
- [12] Kim J Y, Park Y J, Lee J H, Kim Z H, Park C M. EIN3-mediated ethylene signaling attenuates auxin response during hypocotyl thermomorphogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 2021, 62(4): 708-720
- [13] Wang L K, Zhang Z Y, Zhang F, Shao Z Y, Zhao B, Huang A, Tran J, Hernandez F V, Qiao H. EIN2-directed histone acetylation requires EIN3-mediated positive feedback regulation in response to ethylene. *The Plant Cell*, 2021, 33(2): 322-337
- [14] Zheng Y Y, Lan Y H, Shi T L, Zhu Z Q. Diverse contributions of MYC2 and EIN3 in the regulation of *Arabidopsis* jasmonate-responsive gene expression. *Plant Direct*, 2017, 1(4): 15
- [15] Peng J Y, Li Z H, Wen X, Li W Y, Shi H, Yang L S, Zhu H Q, Guo H W. Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): 4664
- [16] Hunjan M S, Kumar S, Lore J S, Cruz Casiana M V. Efficiency of different *Rhizoctonia solani* inoculum source against sheath blight screening in rice under field conditions. *Tropical Plant Pathology*, 2022, DOI: 10.1007/S40858-021-00489-3
- [17] Imad K, Mohammed A, Abdellatif B, Ei H A, Amina O T, Allal D. Morphological, pathogenic and molecular characterisation of *Rhizoctonia solani* strains isolated from potato. *Annual Research & Review in Biology*, 2018: 1-16
- [18] 康珍, 杨迪, 郝彦蓉, 卢翔, 周美亮, 方正武. 苦荞转录因子 FtMYB41 的克隆及功能分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(3): 895-905
Kang Z, Yang D, Hao Y R, Lu X, Zhou M L, Fang Z W. Molecular cloning and functional analysis of transcription factor FtMYB41 in tartary buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(3): 895-905
- [19] 杨迪, 张凯旋, 赵辉, 伍小方, 杨克理, 周美亮, 张金林. 苦荞转录因子 FtNAC11 的克隆及其功能分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5): 1430-1441
Yang D, Zhang K X, Zhao H, Wu X F, Yang K L, Zhou M L, Zhang J L. Molecular cloning and functional analysis of transcription factor FtNAC11 in tartary buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(5): 1430-1441
- [20] Xiao Q W, Li H H, Wei Z, Miao T, Qian Q H, Ying N Z, Xue B L, Deng D L, Geng Q H. GhEIN3, a cotton (*Gossypium hirsutum*) homologue of AtEIN3, is involved in regulation of plant salinity tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 143(C): 83-93
- [21] 赵曾强, 张析, 李潇玲, 张薇. GhEIN3 基因对棉花枯萎病胁迫响应的功能分析. *棉花学报*, 2022, 34(3): 173-186
Zhao Z Q, Zhang X, Li X L, Zhang W. Functional analysis of GhEIN3 gene in response to cotton *Fusarium* wilt stress. *Cotton Science*, 2022, 34(3): 173-186
- [22] 宁小萌, 孙晶晶, 冯思雨, 李天骄, 任占辰, 李然红. 白桦 Trihelix 家族全基因组鉴定及抗病表达模式分析. *西北植物学报*, 2022, 42(6): 920-929
Ning X M, Sun J J, Feng S Y, Li T J, Ren Z C, Li R H. Genome identification and disease-resistant expression pattern analysis of trihelix family of *Betula platyphylla*. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 42(6): 920-929
- [23] Anisimova O K, Shchennikova A V, Kochieva E Z, Filyushin M A. Pathogenesis-related genes of PR1, PR2, PR4, and PR5 families are involved in the response to fusarium infection in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6688
- [24] Garg S, Balboa R, Kuja J. Chromosome-scale haplotype-resolved pangenomics. *Trends in Genetics*, 2022, 38(11): 1358
- [25] 杨辉, 白天亮, 朱春艳, 冯培媛, 宋佳伟, 刘晓刚, 李培富, 罗成科, 田蕾. 盐胁迫下水稻种质资源 Na⁺、K⁺平衡和 *SKC1* 单倍型分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2): 1-12
Yang H, Bai T L, Zhu C Y, Feng P Y, Song J W, Liu X G, Li P F, Luo C K, Tian L. Analysis of Na⁺ and K⁺

- homeostasis and *SKC1* haplotype of rice germplasm accessions under salt stress. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 1-12
- [26] Liu H B, Lin X Q, Li X J, Luo Z L, Lu X, You Q, Yang X P, Xu C H, Liu X L, Liu J Y, Wu C W, Wang J P. Haplotype variations of sucrose phosphate synthase B gene among sugarcane accessions with different sucrose content. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 42-42
- [27] Huang Z P, Liu J Q, Lu X Q, Guo Y F, Li Y Y, Liu Y Q, Zhang R Q, Xing L P, Cao A Z. Identification and transfer of a new *Pm21* haplotype with high genetic diversity and a special molecular resistance mechanism. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136(1): 11-15
- [28] 刘银萍. '洛阳红'花期花瓣抗氧化酶SOD、POD和CAT活性的研究. *河南林业科技*, 2020, 40(3): 13-15, 41
- Liu Y P. Study on activities of antioxidant enzymes SOD, POD and CAT in flower petals of 'Luoyang Hong'. *Henan Forestry Science and Technology*, 2020, 40(3): 13-15, 41
- [29] 李易初, 石凤梅, 马立功, 刘佳, 孟庆林. 核盘菌菌丝内POD和SOD活性与其对大豆致病力关系初探. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2021, 33(1): 1-6, 14
- Li Y C, Shi F M, Ma L G, Liu J, Meng Q L. Preliminary study on the relationship between activity of POD and SOD in hyphae and pathogenicity of sclerotinia sclerotiorum on soybean. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2021, 33(1): 1-6, 14
- [30] Maria P, Ernest S, Rafał P, Karin K, Ewa N. Changes in lipid peroxidation in stay-green leaves of tobacco with senescence-induced synthesis of cytokinins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 118: 161-167
- [31] Li J, Feng L D, Li D, Liu X L, Pan Y Y, He J, Zhang J X. ROS regulate NCF2, key metabolic enzymes and MDA levels to affect the growth of *Fusarium solani*. *Agriculture*, 2022, 12(11): 1840

附表 1 *FtEIN3* 基因的多样性分析Table S1 Diversity analysis of *FtEIN3* gene

单倍型 Haplotype	材料编号 Material number	群体 Group	位点				
			45303553	45303556	45303724	45303860	45303876
Hap1	USA527	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GS185	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	AH379	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC236	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN311	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC443	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB389	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB400	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB395	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC223	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB91	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB68	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC451	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB65	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-28	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GS178	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GS346	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB73	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-23	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	XZ316	喜马拉雅野生群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN303	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-30	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx135	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx140	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GZ266	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	JPN325	喜马拉雅野生群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx154	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx144	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx150	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN420	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB396	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN312	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx138	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-337	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC242	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	NX6	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	QH369	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-49	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB63	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G

Hap1	SX-25	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN289	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	YN478	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	XZ94	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	QH362	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC234	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-27	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx123	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GZ411	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-41	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC216	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	GS163	南方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx151	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB402	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC485	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-38	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB391	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SX-34	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC462	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	SC220	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB83	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB385	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	HB383	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx134	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap1	sx152	北方群体	A/A	G/G	T/T	G/G	G/G
Hap2	SC439	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC406	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC208	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC219	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GS348	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	XZ10	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	sx139	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	YN468	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	XZ318	喜马拉雅野生群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC424	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC247	喜马拉雅野生群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC226	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC461	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	sx136	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC440	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC465	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	XZ14	喜马拉雅野生群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	YN480	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GS345	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G

Hap2	NMG2	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GZ271	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GZ412	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	AH251	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GS167	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	GS349	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	HN403	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	NPL323	喜马拉雅野生群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC205	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	SC237	北方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap2	YN483	南方群体	T/A	A/G	C/T	A/G	A/G
Hap3	JX252	南方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	JPN333	喜马拉雅野生群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	GZ414	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	SC213	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	GZ253	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	SX-342	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	sx137	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap3	HB58	北方群体	T/T	A/A	C/C	A/A	A/A
Hap4	SX-114	北方群体	A/A	G/G	C/T	A/G	A/G
Hap4	SC246	北方群体	A/A	G/G	C/T	A/G	A/G
Hap4	SC464	北方群体	A/A	G/G	C/T	A/G	A/G
Hap4	SC249	北方群体	A/A	G/G	C/T	A/G	A/G
Hap5	SC210	北方群体	T/A	A/G	C/C	A/G	A/G
Hap5	SC459	北方群体	T/A	A/G	C/C	A/G	A/G