

# 茄子 TRV-VIGS 体系的优化及 *SmIAA19* 基因功能初步分析

齐东霞<sup>1,\*</sup>, 张映<sup>1,\*</sup>, 赵祯<sup>1</sup>, 张伟伟<sup>1</sup>, 陈钰辉<sup>1</sup>, 连勇<sup>1</sup>, 田时炳<sup>2</sup>, 刘富中<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所, 重庆 400055)

**摘要:** 以经过改造的烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 载体 PYL156 为工具, 采用叶片注射法侵染茄子 (*Solanum melongena* L.) 叶片, 通过表型比较、TRV 病毒分子检测和荧光定量 PCR 技术分析, 探究环境温度、植株大小、目的基因插入片段大小对茄子 TRV-VIGS 沉默体系的影响。结果表明, 昼夜温度为 (25 ± 3) °C 和 (20 ± 2) °C 时, 接种茄子幼苗子叶的植株沉默效果明显, 侵染后植株叶片中目的基因表达量与阴性对照相比明显降低; 早春日光温室和秋季日光温室条件下, 侵染植株表型性状和基因表达量差异不显著。沉默片段大小为 200 bp 左右时目的基因的沉默效果最好; 侵染茄子幼苗子叶期植株出现明显病毒斑, 而接种 6 周龄真叶则无明显表型差异。用茄子生长素诱导基因 (*SmIAA19*) 为靶基因对其进行验证, 结果表明显著抑制了 *SmIAA19* 的表达, 其在叶片中的表达量和生长素含量均显著降低, 表明 *SmIAA19* 是 1 个与生长素代谢途径相关的基因。

**关键词:** 茄子; 烟草脆裂病毒; 病毒诱导的基因沉默; 生长素诱导基因

**中图分类号:** S 641.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 04-0691-11

## Optimization of Virus-induced Gene Silencing System and Function Identification of *SmIAA19* Gene in Eggplant

QI Dongxia<sup>1,\*</sup>, ZHANG Ying<sup>1,\*</sup>, ZHAO Zhen<sup>1</sup>, ZHANG Weiwei<sup>1</sup>, CHEN Yuhui<sup>1</sup>, LIAN Yong<sup>1</sup>, TIAN Shibing<sup>2</sup>, and LIU Fuzhong<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>The Institute of Vegetables and Flowers, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400055, China)

**Abstract:** Virus-induced gene silencing (VIGS) system is a very useful tool for evaluating gene function and molecular mechanism. Many factors, such as vector, viral proliferation and systemic movement throughout the plant, affect the efficiency of VIGS. In order to improve the VIGS silence efficiency in eggplant (*Solanum melongena* L.), three parameters (environment temperature, seedling age and gene fragment size) were optimized. The results showed that the silencing efficiency was higher in

**收稿日期:** 2018-01-18; **修回日期:** 2018-03-16

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31572122); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610102016025); 重庆市院士引导专项 (cstc2017jcyj-yszxX0005); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

\* 共同第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lfzcaas@126.com)

temperature controlled greenhouse [ $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ , daytime and  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ , night] than in room temperature greenhouse. After inoculation of the cotyledons of eggplant, the plants had obvious silencing symptom, but there was no obvious silencing effect when the six-week-old true leaves were inoculated. The silencing frequencies of the gene fragments 597 bp, 442 bp and 205 bp were 56.67%, 62.5% and 68.75% respectively, indicating that about 200 bp might be the most suitable fragment size for VIGS. Then, the function of *SmIAA19* from eggplant IAA family genes was evaluated using this VIGS system. The *SmIAA19* silencing plants presented obvious phenotypic symptoms after inoculation for 4 weeks. The transcript levels of *SmIAA19* and auxin content in the *SmIAA19* silenced plants were significantly reduced compared to the control. It showed that *SmIAA19* was an auxin metabolic related gene in eggplant, and TRV-VIGS system was a reliable method for the function identification of eggplant gene.

**Keywords:** eggplant; *Tobacco rattle virus* (TRV); virus-induced gene silencing (VIGS); *SmIAA19*

病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是一种转录后基因沉默技术 (Ratcliff et al., 1997), 通过含有目的基因的重组病毒载体沉默植株同源基因, 从而导致表型变异, 实现对该基因功能的分析 (Scofield et al., 2005; Senthil-Kumar & Mysore, 2011)。VIGS 技术具有快速、有效、操作简单和适用范围广等优点 (彭燕 等, 2002; Lu et al., 2003; Qu et al., 2003), 其中烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 诱导的基因沉默 (TRV-VIGS), 具有病毒症状温和, 持续时间长和沉默效率高等特点, 是应用较为广泛的一种沉默体系 (Huang et al., 2012), 已在番茄 (Ryu et al., 2004; Fragkostefanakis et al., 2014)、烟草 (Senthil-Kumar et al., 2007; Senthil-Kumar & Mysore, 2014)、辣椒 (Zhang et al., 2015)、马铃薯 (张晓蓓 等, 2014) 和矮牵牛 (Spitaer et al., 2007; Broderick & Jones, 2014) 等植物中成功应用。Liu 等 (2012) 也证明了 TRV-VIGS 体系能在茄子中成功应用, 但其影响因素需进一步探索。

影响 VIGS 沉默效果的因素可以概括为病毒与宿主植物的相互作用及其生长的环境条件 (Burch-Smith et al., 2004)。如插入片段与目的基因的同源性 (Thomas et al., 2001; Holzberg et al., 2002; Tuttle et al., 2008)、插入片段的长度 (Burch-Smith et al., 2006; 张增艳 等, 2006; Liu & Page, 2008)、环境温度 (Liu et al., 2002; Tuttle et al., 2008)、侵染方式 (Fu et al., 2005; Liu et al., 2012) 和植株的生育期 (Cai et al., 2006) 等。插入片段与目的基因的同源性越高, 沉默效果越好, 同源性超过 85% 即可产生有效的基因沉默 (Thomas et al., 2001; Holzberg et al., 2002)。TRV 载体插入片段应控制在 23 ~ 1 500 bp (张增艳 等, 2006), 目的基因片段长度 200 ~ 350 bp 时沉默效果较好 (Burch-Smith et al., 2006; Liu & Page, 2008)。温度是影响病毒传播和宿主植物生长最重要的环境因素之一, 有研究表明, 较低的温度沉默效果优于较高的温度, 当温度高于  $25^\circ\text{C}$  时沉默效果不明显 (Liu et al., 2002; Tuttle et al., 2008)。侵染方式对 VIGS 的沉默效果也有不同程度的影响 (Fu et al., 2005; Liu et al., 2012)。寄主的不同生育期对病毒侵入、增殖和移动均有影响, 同时也会影响 VIGS 的沉默效率 (Cai et al., 2006)。

本研究中以茄子单性结实品系 D-10 为材料, 构建实验室克隆的两个单性结实相关基因: 茄子 (*Solanum melongena* L.) 甲硫氨酸亚砜还原酶 A 基因 (methionine sulfoxide reductase A, *SmMsra*) (张映 等, 2011a) 和生长素诱导基因 (IAA family gene, *SmIAA19*) (张伟伟 等, 2014), 插入片段长度不同的病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 表达载体, 通过对 TRV 病毒诱导的基因沉默效果分析, 研究温度、接种苗龄和目的基因片段长度对 TRV 病毒介导的基因沉默的影响, 以期完善茄子的

TRV-VIGS 体系, 为茄子功能基因组学研究奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

茄子 (*Solanum melongena* L.) 单性结实体系 D-10, 载体 pTRV1 和 pTRV2, 和可引起植株产生白化症状的对照载体 pTRV2-PDS, 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所加工番茄课题组提供。

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒及 pEASY<sup>®</sup>-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 和 FASTPfu 高保真 DNA 聚合酶购自北京全式金有限公司, 琼脂糖凝胶回收和质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。Pentrt<sup>™</sup> Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning Kits 和 Gateway<sup>®</sup> LR Clonase Enzyme Mix 购自美国 invitrogen 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 载体构建

提取茄子单性结实材料开花当天果实的 RNA, 反转录成 cDNA, 利用 Gateway 技术 (毕惠惠等, 2013) 构建 3 个茄子甲硫氨酸亚砷还原酶 A 基因的 VIGS 表达载体 (载体插入片段大小分别为 597、442 和 205 bp), 命名为 p1、p2 和 p3。依据基因的 cDNA 序列设计引物 (表 1), 扩增其 cDNA 序列, 进行平末端 PCR 扩增。扩增产物进行胶回收并转入到大肠杆菌中, 蓝白斑筛选后测序鉴定。对测序正确的胶回收产物进行平末端 PCR 扩增, 扩增产物与 pENTR<sup>™</sup> D-TOPO<sup>®</sup> 载体连接并转入到大肠杆菌中, 菌液 PCR 后测序验证。通过 LR 反应将连接在入门载体上的插入片段转接到 pTRV2 载体上, 并转入到大肠杆菌中, 对阳性菌落测序鉴定。将检测正确的表达载体转化到农杆菌 GV3101 中备用。

利用 In-Fusion 技术 (根据 pEASY<sup>®</sup>-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 说明书) 构建 1 个插入片段为 256 bp 的生长素诱导基因 (*SmlAA19*) 的 VIGS 表达载体, 命名为 p4。依据 *SmlAA19* 序列设计引物 (表 1), 并在引物上加 15 ~ 25 bp 与线性化载体同源的接头, 以 cDNA 为模板用高保真 DNA 聚合酶进行平末端扩增, 扩增产物进行胶回收。根据 pEASY<sup>®</sup>-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 说明书进行连接反应, 将插入片段连接到线性化载体 pTRV2 中, 并转入 Trans1-T1 大肠杆菌感受态中, 对阳性单克隆测序鉴定。将检测正确的表达载体转化到农杆菌 GV3101 中备用。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物 Primer name	序列 (5' - 3') Sequence	片段大小/bp Sequence size
p1	F: CACCATGGCTTCCAAAGAAGAG; R: ACCGTAGCACCTTATTGG	597
p2	F: CACCAAGCGACTCAACCACCAAT; R: ACCGTAGCACCTTATTGG	442
p3	F: CACCTGATGCTCAGGCTCAACT; R: ACCGTAGCACCTTATTGG	205
p4	F: GCCTCCATGGGGATCCAGGAAAGTTGATTGAGCAC R: GCTCGGTACCGGATCCCCCTATCACGTTTACCTCTG	256
RNA1	F: TTACAGGTTATTTGGGCTAG; R: CCGGGTTCAATTCCTTATC	647
RNA2	F: TACGACGAACCAAGGG; R: TGCGAAACTCAAATGCT	427
Actin	F: ATCCAGCCTTACCATTCCA; R: GGTCATCATCTCCGGTTTGC	150

### 1.2.2 不同处理条件对 VIGS 的影响及验证

分别探索温度、接种苗龄和插入片段长度对茄子的 VIGS 的影响。

温度处理：分别在非控温日光温室条件（早春日光温室和秋日光温室）和控温温室条件下将表达载体 p3 接种到茄子幼苗子叶，用温湿度记录仪记录试验期间的温度。早春日光温室日最低温度为 9~22 °C，日最高温度为 20~41 °C；秋日光温室日最低温度为 8~20 °C，日最高温度为 19~38 °C。控温温室条件下昼夜温度分别控制为 (25±3) °C 和 (20±2) °C，相对湿度为 60%~75%。

接种苗龄处理：控温温室条件下，接种表达载体 p3 到茄子幼苗子叶和 6 周龄真叶。

插入片段长度处理：控温温室条件下接种茄子幼苗子叶，载体的插入片段长度分别为 205、442 和 597 bp。

利用以上研究优化的 TRV-VIGS 体系对基因 *SmIAA19* 的功能进行初步分析。

### 1.2.3 农杆菌侵染

将含有目标载体 pTRV1、pTRV2、pTRV2-PDS、p1、p2、p3 和 p4 的农杆菌 GV3101 涂布在 LB 固体培养基（含 50 mg·L<sup>-1</sup> Kan 和 50 mg·L<sup>-1</sup> Rif）中，28 °C，倒置暗培养。挑取单克隆于 LB 液体培养基（含有相同浓度的 Kan 和 Rif）中，28 °C，200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养。培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.8 时，取 500 μL 菌液转接到 50 mL 细菌培养基（YEB）中，28 °C，200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养。培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.8 时，取 45 mL 菌液离心收集（4 000 r·min<sup>-1</sup>，8 min），用新鲜 MMA[含 20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖，5 g·L<sup>-1</sup> 含盐不含维生素的 MS 培养基，1 mol·L<sup>-1</sup> 2-(N-吗啡啉)乙磺酸，pH 5.6，200 μmol·L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮]培养基悬浮菌液，重悬菌液的 OD<sub>600</sub> 保持为 1.0~2.0。将 pTRV1 分别与其他菌液 1:1 混合，室温静置 1 h 后用于侵染。采用 5 mL 无菌注射器通过叶片注射侵染法进行接种（傅达其，2016）。侵染子叶时，从子叶背部进行注射，使菌液充满整片子叶。侵染真叶时，对植株上部两片嫩叶进行注射。试验植株包括空白对照（不处理）、pTRV2 空载的阴性对照、含 pTRV2-PDS 载体的阳性对照、沉默 *SmMsrA* 基因的 3 个 VIGS 表达载体 p1、p2、p3 和沉默 *SmIAA19* 基因的 VIGS 表达载体 p4。

### 1.2.4 植株表型性状鉴定

侵染后 21 d，通过比较白化或 TRV 病毒导致的花叶表型的植株数与接种的总植株数的百分比评估基因沉默频率。测量株高、株幅、叶长和叶宽等植株表型数据，评估基因沉默对植株表型的影响。

### 1.2.5 荧光定量 PCR 分析

取接种后 28 d 不同处理植株嫩叶，提取总 RNA，并用随机引物合成 cDNA。用特异引物 RNA1 和 RNA2（表 1）检测 TRV 病毒。对处理植株中内源基因的表达量进行 qRT-PCR 检测。取接种后不同处理植株嫩叶，提取 RNA，反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板，根据基因插入片段设计荧光定量引物，以肌动蛋白基因 (*Actin*) 为内参基因（表 1），使用 Roche Light Cycler480 进行荧光定量 PCR 分析。反应体系 10 μL：模板 2 μL，上、下游引物各 0.5 μL，SYBR Green Master Mix 5 μL，ddH<sub>2</sub>O 2 μL。反应程序为：95 °C 10 min；95 °C 10 s，57 °C 20 s，72 °C 30 s，50 个循环后作熔解曲线（95~65 °C，0.1 °C·s<sup>-1</sup>）。具体方法参考张映（2011b）的。

### 1.2.6 生长素含量的检测

接种 45 d 后，采用酶联免疫吸附分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）测定各处理植株叶片内源生长素（IAA）含量，设 3 次重复。试剂盒由中国农业大学提供。

使用 Excel 2010 软件和 SPSS 软件处理数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 VIGS 表达载体的构建

对构建的 VIGS 表达载体进行 PCR 检测, 出现符合预期的 597、442、205 和 256 bp 目的条带(图 1), 且测序结果完全正确, 表明 *SmMsrA* 的 VIGS 表达载体 p1、p2 和 p3, *SmIAA19* 的 VIGS 表达载体 p4 构建成功。

将构建成功的 VIGS 表达载体热激转化到农杆菌 GV3101 中, 并对其进行 PCR 扩增检测, 结果与预期相符, 出现目的片段, 表明 4 个 VIGS 表达载体成功转入农杆菌 GV3101。

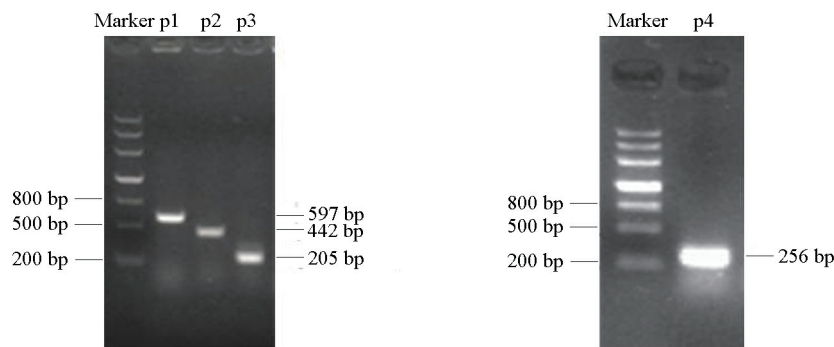


图 1 PCR 检测 VIGS 表达载体 p1、p2、p3、p4

Fig. 1 PCR identification of VIGS expression vectors p1, p2, p3 and p4

### 2.2 温度对沉默效果的影响

#### 2.2.1 非控温日光温室条件下的沉默效果

分别将空白对照植株, 以及阳性对照 pTRV2-PDS、阴性对照 pTRV2 和 *SmMsrA* 表达载体 p3 的农杆菌液侵染茄子幼苗子叶的植株, 培养在早春日光温室中 21 d 后, 空白对照正常生长, 无病毒斑和白化现象, 29 株 pTRV2-PDS 处理株中有 10 株第 2 片真叶上出现白化现象, 沉默率为 34.48% (图 2, pTRV2-PDS); 28 株阴性对照 pTRV2 处理株中有 2 株第 2 片真叶上出现病毒斑, 沉默率为 7.14%; 26 株 p3 处理株中有 4 株第 2 片真叶上出现病毒斑, 沉默率为 15.38%, pTRV2 和 p3 侵染后 28 d 病毒斑未扩散。秋日光温室未出现明显白化现象和病毒斑 (图 2, 对照、P3), 但是处理株的株高和生长速度稍小于对照株。

#### 2.2.2 控温温室条件下的沉默效果

分别将空白对照植株, 以及阳性对照 pTRV2-PDS、阴性对照 pTRV2 和 *SmMsrA* 表达载体 p3 的农杆菌液侵染茄子幼苗子叶的植株, 在控温温室中培养 21 d 后, 空白对照正常生长, 无病毒斑和白化现象, 32 株 pTRV2-PDS 处理株中 28 株出现白化现象, 沉默率达 87.5%, 28 d 时白化现象明显; 32 株阴性对照 pTRV2 处理株中 28 株出现病毒斑, 且叶片发黄, 生长势弱沉默率达 87.5%; 31 株 p3 处理株中 21 株叶片出现病毒斑, 且叶片发黄, 生长势弱, 沉默率达 68.75% (图 3), 且叶片发黄, 生长势弱。阳性对照 pTRV2-PDS 的白化现象持续时间较长, 4 个月后植株基部萌发的侧枝仍然表型为白化现, 说明 TRV 病毒介导的基因沉默效率较高, 基因沉默期较长。

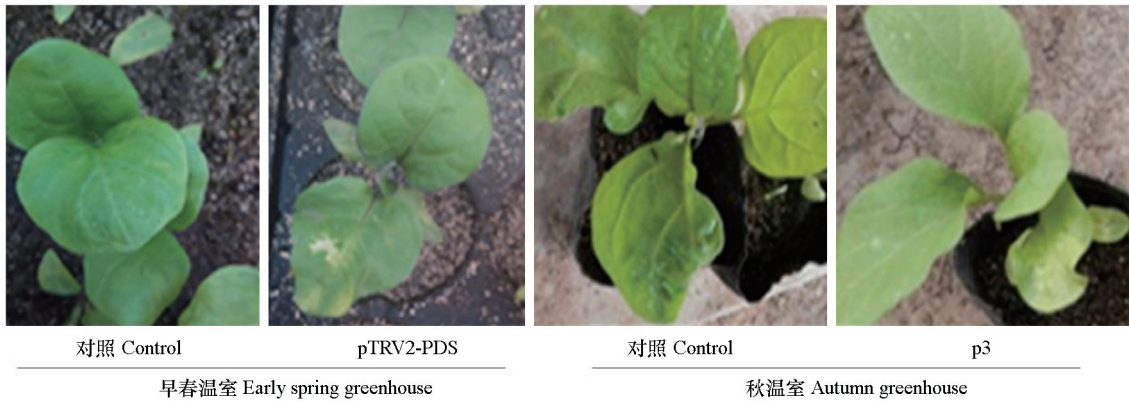


图 2 非控温温室中侵染茄子幼苗子叶后沉默表型  
 Fig. 2 The silence phenotype of infested eggplant seedling cotyledon in common greenhouse

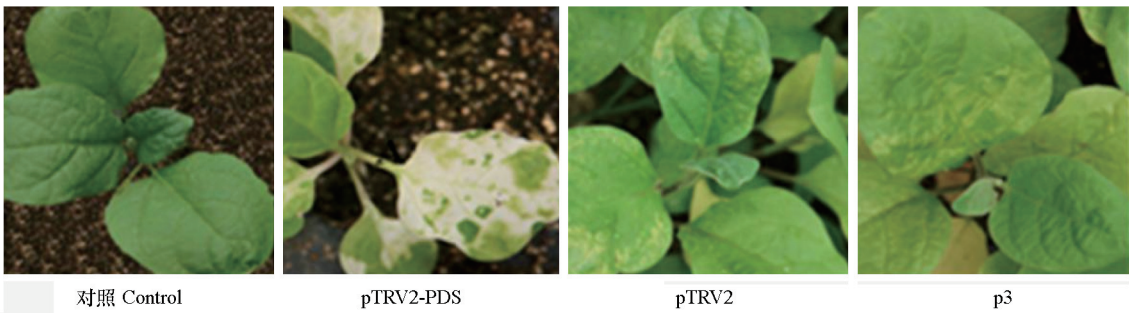


图 3 控温温室中侵染茄子幼苗子叶后沉默表型  
 Fig. 3 The silence phenotype of infested eggplant seedling cotyledon in temperature-controlled greenhouse

对处理株嫩叶 *SmMsrA* 的表达量进行荧光定量 PCR 分析。结果表明, 与 pTRV2 阴性对照相比, p3 处理株叶片中 *SmMsrA* 的表达量显著降低, 为阴性对照的 36% (图 4), 说明沉默效果显著。

### 2.3 接种苗龄对沉默效果的影响

#### 2.3.1 侵染幼苗期子叶

即控温温室条件下接种茄子幼苗子叶, 沉默 pTRV2-PDS 处理株叶片白化; pTRV2 和 p3 处理, 植株叶片出现病毒斑且叶片发黄, 生长势弱, 基因表达量也显著降低, 表明控温温室条件下接种茄子幼苗子叶期沉默效果显著。

#### 2.3.2 侵染 6 周龄真叶

控温温室条件下侵染茄子 6 周龄真叶, 28 d 后, 与空白对照相比, 处理株均没有明显表型差异, 表明控温温室条件下接种茄子 6 周龄真叶沉默效果不显著。推测侵染时植株较大, 叶片较硬, 纤维化明显, 植株抗病毒侵染能力增强, 侵染的菌量相对整个植株较少, 导致基因沉默效果不能显现。

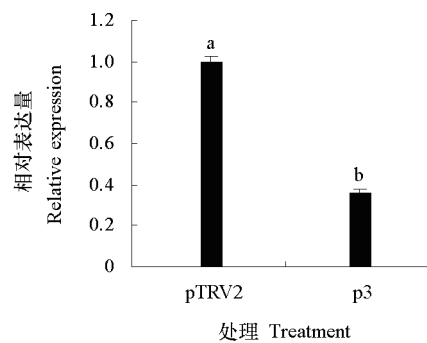


图 4 *SmMsrA* 基因在不同处理株中的相对表达量  
 Fig. 4 Relative expression of *SmMsrA* in different treatments

## 2.4 目的基因插入片段长度对沉默效果的影响

在控温温室条件下侵染茄子幼苗子叶后 21 d, 统计基因沉默率。阴性对照 pTRV2、阳性对照 pTRV2-PDS、处理株 p1、p2 和 p3 分别有 28 株、28 株、17 株、19 株和 21 株出现表型, 沉默率分别为 87.5%、87.5%、56.67%、62.5% 和 68.75%, p3 沉默率最高, p2 其次, p1 最低。

每处理取 3 个重复, 每个生物学重复取 3 个单株, 以 *Actin* 为内参基因, 对基因表达量进行分析。结果(图 5)表明, 与阴性对照 pTRV2 相比, p1、p2、p3 的表达量显著降低, 在插入片段约 205 bp 的表达载体 p3 沉默效果最好。

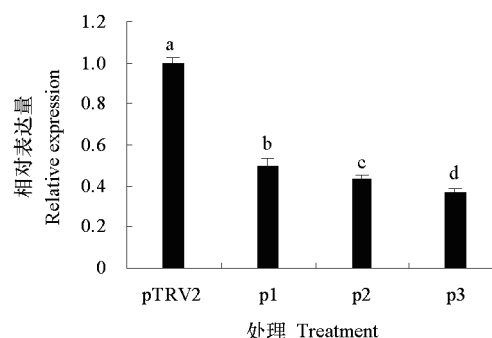


图 5 控温温室条件下侵染子叶后叶片中 *SmMsrA* 基因的相对表达量

Fig. 5 Leaves relative expression of *SmMsrA* after infested cotyledon in temperature-controlled greenhouse

## 2.5 验证 *SmIAA19* 的功能

### 2.5.1 表型性状

在控温温室条件下, 采用叶片注射法侵染茄子幼苗子叶, 其中阴性对照 pTRV2、阳性对照 pTRV2-PDS、沉默 *SmIAA19* 基因的处理株 p4 分别接种了 90 株、64 株和 96 株。侵染 15 d 后有 61 株 pTRV2-PDS 处理株出现白化现象, 20 d 后阴性对照 pTRV2 和 p4 处理株分别有 89 和 92 株叶片上出现病毒斑, 28 d 后, 表型依然明显(图 6)。与空白对照相比, 侵染后 28 d, 沉默 pTRV2、pTRV2-PDS 和 p4 植株的株高、株幅、叶长和叶宽 4 个性状均变小(表 2), 说明病毒侵染会导致植株生长势变弱。侵染后 28 d, 统计基因沉默频率。pTRV2、TRV2-PDS 和 p4 的沉默频率分别为 98.8%、95.3% 和 95.8%, 沉默频率较高。

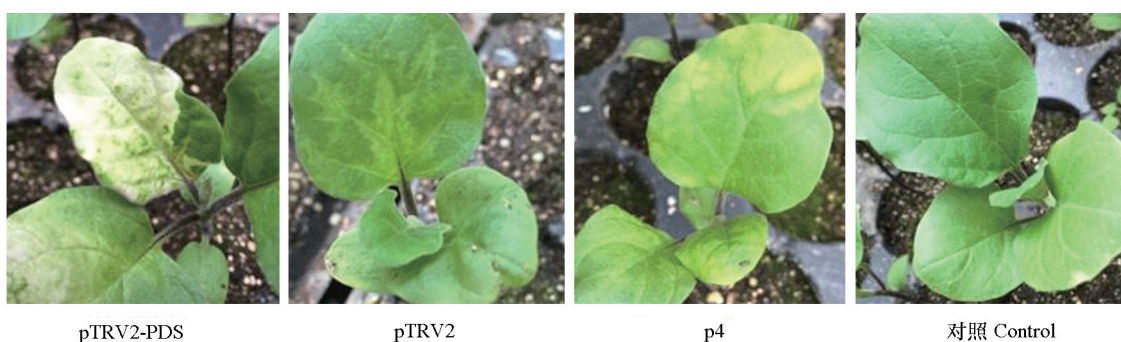


图 6 侵染后 28 d 植株沉默表型

Fig. 6 The silencing phenotype 28 days after infection

表 2 侵染后 28 d 表型数据

Table 2 The phenotypic data 28 days after infection

处理 Treatment	株高/cm Height	株幅/cm Spacing	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width
对照 Control	10.96 ± 1.16 a	7.38 ± 1.25 a	4.65 ± 0.64 a	3.91 ± 0.55 a
pTRV2-PDS	8.49 ± 1.35 b	5.85 ± 0.91 b	3.54 ± 0.36 b	3.32 ± 0.71 b
pTRV2	8.30 ± 1.01 b	3.95 ± 0.81 c	3.27 ± 0.51 b	2.43 ± 0.47 c
pTRV2- <i>SmIAA19</i>	8.52 ± 0.74 b	4.47 ± 1.23 c	3.02 ± 0.42 b	2.53 ± 0.44 c

### 2.5.2 病毒分子检测

以特异引物RNA1和RNA2对处理株叶片进行TRV病毒检测。结果(图7)表明,沉默pTRV2-PDS、pTRV2和p4的植株中均出现病毒的两条特异性条带,空白对照中无特异性扩增。说明TRV病毒成功侵入到了茄子植株中。

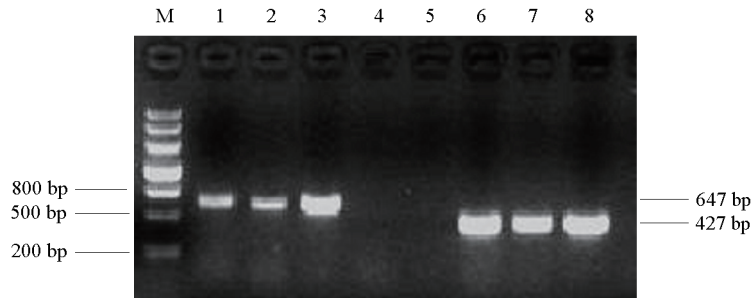


图7 处理株 TRV 病毒 RNA1 和 RNA2 的检测

M: Marker; 1、6: pTRV2-PDS; 2、7: p4; 3、8: pTRV2; 4、5: 对照。

Fig. 7 TRV virus RNA1 and RNA2 detection in treatments

M: Marker; 1, 6: pTRV2-PDS; 2, 7: p4; 3, 8: pTRV2; 4, 5: Control.

### 2.5.3 qRT-PCR 分析和生长素 (IAA) 含量的变化

以 *Actin* 为内参基因,对处理株的叶片进行基因表达量分析。结果(表3)表明,与空白对照和阴性对照 pTRV2 相比, p4 处理株叶片中 *SmLAA19* 的表达量显著降低。p4 处理株基因的表达量是 pTRV2 的 43.5%, 是空白对照的 50.14%。阴性对照 pTRV2 比空白对照的 *SmLAA19* 基因表达量高,说明病毒对基因的表达量有一定影响。空白对照、阴性对照 pTRV2 和 p4 处理植株的生长素含量分别为 76.9、76.3 和 32.8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。p4 处理植株生长素含量是 pTRV2 的 42.94%, 是对照的 42.61%, 处理株 pTRV2 与空白对照的生长素无差异, 说明 *SmLAA19* 的表达与生长素含量的变化相关。

表3 处理株 *SmLAA19* 相对表达量和生长素相对含量

Table 3 Relative expression of *SmLAA19* and auxin relative content in treatments

处理 Treatment	相对表达量 Relative expression	生长素含量/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) Auxin content
对照 Control	0.0262 ± 0.0019 a	76.9 ± 1.7 b
pTRV2	0.0337 ± 0.0025 a	76.3 ± 2.0 a
p4	0.0169 ± 0.0014 b	32.8 ± 1.6 c

## 3 讨论

烟草脆裂病毒 (TRV) 诱导的基因沉默 (TRV-VIGS) 是目前应用广泛的一种沉默体系 (Huang et al., 2012)。本研究中以经过改造的 TRV 载体 PYL156 为工具, 构建了 4 个 VIGS 表达载体, 利用注射压迫法, 在 20 ~ 25 °C 侵染茄子幼苗子叶, 有效降低了叶片中目的基因转录水平的表达量, 证明改造后的 TRV 载体适用于茄子的 VIGS 沉默技术体系, 为研究茄子的功能基因组学提供了技术平台。

影响 VIGS 效果的因素有环境条件、目的基因插入片段长度、侵染方式和接种苗龄等 (张增艳等, 2006; 宋震 等, 2014)。研究表明环境温度高于 28 °C 时 TRV 介导的 VIGS 几乎被完全抑制,



较低的温度、湿度有利于 VIGS 反应的发生 (Fu et al., 2006)。载体和宿主植物不同, 沉默的最适温度也不同, TRV 载体侵染番茄最适温度低于或等于 21 °C (Burch-Smith et al., 2004), 本氏烟适宜的温度为 22 ~ 25 °C (Xu et al., 2007), 牵牛花的最适沉默昼/夜温度是 20 °C/18 °C (Broderick et al., 2014), 杨树最适温度为 28 °C (Shen et al., 2015)。本研究中发现, 昼夜温度控制在 20 ~ 25 °C, 相对湿度在 60% ~ 75% 的条件下, 侵染茄子幼苗子叶, 沉默效果显著。而日光温室非控温条件下, 侵染茄子幼苗子叶后无明显表型, 原因可能是温度过高, 高温导致植物体内病毒含量降低, 基因沉默效率也明显降低。茄子是喜温作物, 最适生长昼/夜温度是 30 °C/20 °C, 而高温环境又会使病毒的含量降低, 因此 20 ~ 25 °C 是 TRV 载体侵染茄子的适合温度。为保证有效地基因沉默, 本研究中构建了 3 个插入片段大小分别为 205、442 和 559 bp 的 VIGS 表达载体, 控温温室条件下, 采用注射压迫法侵染茄子幼苗子叶, 目的基因表达量均明显降低, 以 205 bp 的插入片段沉默效果最好; 长度为 200 bp 的阳性对照八氢番茄红素脱氢酶基因 (phytoene desaturase, PDS) 和长度为 256 bp 的 *SmIAA19* 基因在相同条件下沉默效果明显, 说明茄子插入片段在 200 bp 左右沉默效果显著, 这与前人在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中的研究结果 (Burch-Smith et al., 2006; Liu & Page, 2008) 一致。

有研究表明, 一些植物的苗龄大小影响病毒在植株体内的增殖和移动, 从而影响 VIGS 的沉默效率 (Cai et al., 2006)。本研究中采用叶片注射法分别侵染茄子幼苗子叶和 6 周龄幼苗真叶, 前者沉默效果显著, 后者沉默不明显。Liu 等 (2012) 用高压喷枪法和叶片注射法侵染茄子 4 周龄幼苗, 结果表明高压喷枪法侵染的沉默效果较好, 这可能由于真叶纤维化明显, 注射压迫法压力较小, 菌液不易渗透, 导致叶片中病毒量较少, 沉默效果不明显, 而高压喷枪法能保证侵染到植株体内的病毒量, 因此可产生明显表型, 表明茄子 VIGS 侵染沉默效果与侵染方法和茄子植株大小有关, 高压喷枪法适合侵染苗龄较大植株, 叶片注射法适合侵染茄子子叶期幼苗。在马铃薯、杨树和棉花等作物中基因型对 VIGS 的沉默效率有影响 (王心宇 等, 2014; 张晓萝 等, 2014; Shen et al., 2015), 本试验建立的 VIGS 体系在茄子材料中的广谱性也需进一步验证。

张伟伟等 (2014) 以茄子单性结实品系 D-10 为试验材料, 克隆获得了茄子生长素诱导基因 *SmIAA19* 的 cDNA 序列, 初步分析其在果实的发育中上调表达。本研究利用基于 TRV 诱导的基因瞬时沉默技术降低了 *SmIAA19* 在 D-10 叶片中的转录本水平, 生长素含量测定结果也表明, *SmIAA19* 表达沉默的 D-10 叶片中生长素含量显著低于空白对照和阴性对照, 证明 *SmIAA19* 与生长素代谢相关, 但其是否与茄子果实的发育及单性结实的形成有关需进一步探究。

## References

- Bi Hui-hui, Wang Gen-ping, Wang Cheng-she, Xia Lan-qin. 2013. Construction of RNAi and overexpression vectors for genetic transformation of monocotyledonous plants based on gateway technology. *Journal of Plant Genetic Resources*, 14 (1): 115 - 123. (in Chinese)
- 毕惠惠, 王根平, 王成社, 夏兰琴. 2013. 单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建. *植物遗传学报*, 14 (1): 115 - 123.
- 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 (1): 219 - 233.
- Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, Dinesh-Kumar S P. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal*, 39 (5): 734 - 736.
- Burch-Smith T M, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar S. 2006. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142 (1): 21 - 27.
- Cai X Z, Xu Q F, Wang C C, Zheng Z. 2006. Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the RPS2-dependent resistance signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 62 (1): 223 - 232.

- Fragkostefanakis S, Sedeek K E M, Raad M, Zaki M S, Kalaitzis P. 2014. Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology*, 85 (4): 459 - 471.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Jiang, W B, Luo Y B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant Journal*, 43 (2): 299 - 308.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Zhang H X, Xie Y H, Jiang W B, Zhao X D, Luo K B. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecules Cells*, 21 (1): 153 - 160.
- Fu Da-qi. 2016. Leaves syringe method. Operational guidance of virus-induced gene silencing in plant. Beijing: China Agricultural University Press: 52 - 57. (in Chinese)
- 傅达奇. 2016. 叶片注射侵染法. 植物中病毒诱导基因沉默技术操作指导. 北京: 中国农业大学出版社: 52 - 57.
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue G P. 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant Journal*, 30 (3): 315 - 327.
- Huang C J, Qian Y J, Li Z H, Zhou X P. 2012. Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *Science China Life Sciences*, 55 (2): 99 - 108.
- Liu E, Page J E. 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using *Tobacco rattle virus*. *Plant Methods*, 4 (5): 1 - 13.
- Liu H P, Fu D Q, Zhu B Z, Yan, H X, Shen X Y, Zuo J H, Zhu Y, Luo Y B. 2012. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 54 (6): 422 - 429.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, 31: 777 - 786.
- Lu R, Martin-hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plant. *Methods*, 30 (4): 296 - 303.
- Peng Yan, Cui Xiao-feng, Zhou Xue-ping. 2002. Plant viruses-novel vectors for expressing foreign genes. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 28 (4): 465 - 472. (in Chinese)
- 彭燕, 崔晓峰, 周雪平. 2002. 植物病毒——新型的外源基因表达载体. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 28 (4): 465 - 472.
- Qu J, Guo X Q, Ci X Y, Dong Q, Wen F J. 2003. Recent advances on molecular biology of *Potato virus X* and its application to gene expression vector. *Virologica Sinica*, 18 (1): 87 - 92.
- Ratcliff F, Harrison B D, Baulcombe D C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276 (5318): 1558 - 1560.
- Ryu C M, Anand A, Kang L, Mysore K. 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous* species. *The Plant Journal*, 40 (2): 322 - 331.
- Scofield S R, Huang L, Brandt A S, Gill B S. 2005. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiology*, 138 (4): 2165 - 2173.
- Senthil-Kumar M, Hema R, Anand A, Li K, Udayakumar M, Mysore, Kirankumar S. 2007. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 176 (4): 782 - 791.
- Senthil-Kumar M, Mysore K S. 2011. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science*, 16 (12): 656 - 665.
- Senthil-Kumar M, Mysore K S. 2014. *Tobacco rattle virus*-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols*, 9 (7): 1549 - 1562.
- Shen Z, Sun J, Yao J, Wang S, Ding M, Zhang H, Qian Z, Zhao N, Sa G, Zhao R, Shen X, Polle A, Chen S. 2015. High rates of virus-induced gene silencing by *Tobacco rattle virus* in *Populus*. *Tree Physiology*, 35 (9): 1016 - 1029.
- Song Zhen, Li Zhong-an, Zhou Chang-yong. 2014. Research advances of virus-induced gene silencing (VIGS). *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (9): 1885 - 1894. (in Chinese)
- 宋震, 李中安, 周常勇. 2014. 病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 研究进展. *园艺学报*, 41 (9): 1885 - 1894.
- Spitaer B, Zvi M M, Ovadis M, Marhevka E, Barkai O, Edelbaum O, Marton I, Masci T, Alon M, Morin S, Rogachev I, Aharoni A, Vainstein A. 2007. Reverse genetics of floral scent: application of tobacco rattle virus-based gene silencing in *Petunia*. *Plant Physiology*, 145 (4): 1241 - 1250.
- 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 benthamiana* using a *Potato virus X* vector. *The Plant Journal*, 25 (4): 417 - 425.
- Tuttle J R, Idris A M, Brown J K, Haigler C, Robertson D. 2008. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiology*, 148 (1): 41 - 50.
- Wang Xin-yu, Lü Kun, Cai Cai-ping, Xu Jun, Guo Wang-zhen. 2014. Establishment and application of TRV-mediated virus-induced gene silencing in cotton TRV. *Acta Agronomica Sinica*, (8): 1356 - 1363. (in Chinese)
- 王心宇, 吕坤, 蔡彩平, 徐君, 郭旺珍. 2014. TRV 病毒介导的基因沉默体系在棉花中的建立及应用. *作物学报*, (8): 1356 - 1363.
- Xu Y P, Zheng L P, Xu Q F, Wang, C C, Zhou X P, Wu Z J, Cai X Z. 2007. Efficiency for gene silencing induction in *Nicotiana* species by a viral satellite DNA vector. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (12): 1726 - 1733.
- Zhang Wei-wei, Liu Fu-zhong, Zhang Ying, Zhao Zhen, Chen Yu-hui, Lian Yong. 2014. Cloning and characterization of IAA family gene *SmLAA19* in eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (11): 2231 - 2240. (in Chinese)
- 张伟伟, 刘富中, 张映, 赵祯, 陈钰辉, 连勇. 2014. 茄子生长素诱导基因 *SmLAA19* 的克隆和分析. *园艺学报*, 41 (11): 2231 - 2240.
- Zhang Xiao-luo, Zhang Zhi-wei, Na Ren, Yang Shu-qing, Gao Jing, Zhao Jun. 2014. The Effects of different potato genotypes and different inoculation methods on VIGS silence efficiency. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 29 (1): 36 - 40. (in Chinese)
- 张晓萝, 张之为, 娜仁, 杨叔清, 高婧, 赵君. 2014. 马铃薯沉默体系的研究. *华北农学报*, 29 (1): 36 - 40.
- Zhang Ying, Chen Yu-hui, Zhang Zhen-xian, Fang Zhi-yuan, Lian Yong, Liu Fu-zhong. 2011a. cDNA cloning and characterization of a eggplant peptide methionine sulfoxide reductase (*SmMsrA*). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1469 - 1478. (in Chinese)
- 张映, 陈钰辉, 张振贤, 方智远, 连勇, 刘富中. 2011a. 茄子甲硫氨酸亚砷还原酶 (*SmMsrA*) 基因 cDNA 全长的克隆和分析. *园艺学报*, 38 (8): 1469 - 1478.
- Zhang Ying, Liu Fu-zhong, Li Xinag-jing, Chen Yu-hui, Zhang Zhen-xian, Fang Zhi-yuan, Lian Yong. 2011b. Expression analysis of eggplant parthenocarpic candidate genes. *China Vegetables*, (16): 20 - 26. (in Chinese)
- 张映, 刘富中, 李香景, 陈钰辉, 张振贤, 方智远, 连勇. 2011b. 茄子单性结实候选基因的表达分析. *中国蔬菜*, (16): 20 - 26.
- Zhang Z, Li D W, Jin J H, Yin Y X, Zhang H X, Chai W G, Gong Z H. 2015. VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by *CaMYB* in chili pepper leaves. *Frontiers in Plant Science*, DOI: 10.3389/fpls.2015.00500.
- Zhang Zeng-yan, Yao Wu-lan, Xin Zhi-yong. 2006. Advances on virus-induced gene silencing for gene function characterization in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 7 (1): 100 - 105. (in Chinese)
- 张增艳, 姚乌兰, 辛志勇. 2006. 植物基因功能鉴定新工具病毒诱导基因沉默技术的研究进展. *植物遗传资源学报*, 7 (1): 100 - 105.