

# 茄子 *SmMsrA* 基因 VIGS 表达载体的构建及表达分析

赵 祯, 刘富中\*, 张 映, 齐东霞, 陈钰辉, 连 勇

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 利用 RT-PCR 从茄子单性结实体系 D-10 中获得甲硫氨酸亚砷还原酶 A 基因 (*SmMsrA*) 的编码区。通过 Gateway 同源重组技术, 构建了 3 个分别含 *SmMsrA* 基因不同片段的烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 介导的基因沉默 (VIGS) 表达载体 pTRV2-*SmMsrA*i。表达载体转入农杆菌 GV3101 后, 用注射压迫法侵染茄子叶片。采用表型观察、TRV 病毒分子检测和 qRT-PCR 技术, 评价构建的 VIGS 体系对 *SmMsrA* 基因的沉默效果。结果表明, 报告基因 *PDS* 沉默后叶片呈现明显的光漂白现象, *SmMsrA* 基因沉默后叶片呈花叶状, 果实变小, 叶片和果实中的 *SmMsrA* 基因的表达量明显降低, 表明 *SmMsrA* 基因是正向调控茄子果实发育的相关基因。

**关键词:** 茄子; *SmMsrA* 基因; VIGS; Gateway 技术; 果实发育

**中图分类号:** S 641.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 08-01495-10

## VIGS Expression Vector Construction and Expression Analyses of *SmMsrA* Gene in Eggplant

ZHAO Zhen, LIU Fu-zhong\*, ZHANG Ying, QI Dong-xia, CHEN Yu-hui, and LIAN Yong

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The coding sequence of methionine sulfoxide reductase A (*SmMsrA*) was amplified from eggplant (*Solanum melongena* L.) parthenocarpic line D-10 using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Through the Gateway recombination technology, three TRV (*Tobacco rattle virus*) -mediated VIGS expression vectors were constructed, pTRV2-*SmMsrA*i, containing different fragments of *SmMsrA* gene. The VIGS expression vectors were transformed into *Agrobacterium* strain GV3101, and then inoculated eggplant leaves by Agro-syringe. Phenotypes observation, TRV molecular detection and qRT-PCR thechnology were used to observe and evaluate the VIGS system for silencing the *SmMsrA* gene effection. The results showed that the positive control of silencing reporter gene *PDS* showed photo-bleaching phenotype in eggplant leaves; Silencing *SmMsrA* gene were observed pale yellow (mosaic) leaves and bore smaller fruits; The expression of *SmMsrA* gene was decreased obviously in the leaves and fruits of the infected eggplant plants. These results suggested that the

收稿日期: 2015-03-09; 修回日期: 2015-06-11

**基金项目:** 国家‘863’计划项目 (2012AA100202); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 科技部国际合作项目 (2011DFR31180); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

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

*SmMsrA* gene was a related gene in positive regulation of fruit development in eggplant.

**Key words:** eggplant; *SmMsrA* gene; VIGS; Gateway technology; fruit development

单性结实指胚珠不经受精, 子房正常发育形成无籽果实的现象。茄子单性结实性在一定程度上能够克服低温引起的落花、落果, 增强坐果能力, 显著提高产量, 还可以改进果实品质, 降低栽培成本(李香景 等, 2012)。因此, 克隆单性结实的相关基因并研究其作用机制, 对指导单性结实品种的育种工作具有重要意义。

本课题组在已构建的茄子单性结实抑制差减文库的基础上, 利用 RACE 技术克隆获得茄子甲硫氨酸亚砷还原酶 A 基因 (*SmMsrA*), 并发现在低温条件下单性结实品系开花当天子房中 *SmMsrA* 的表达量显著高于非单性结实品系, 茄子单性结实可能与多胺相关(张映 等, 2011)。甲硫氨酸亚砷还原酶 (Msr) 是多胺合成过程中的重要酶类, 茄子果实发育初期较高的多胺水平有利于茄子果实发育和单性结实(李艳玮, 2013)。研究表明 MsrA 具有影响果实发育 (DellaPenna et al., 1989) 和抵抗非生物胁迫的作用 (Romero et al., 2004)。在对拟南芥 (Bethcold et al., 2004; Romero et al., 2004)、水稻 (Guo et al., 2009)、番茄 (Dai & Wang, 2012) 和小麦 (李翔, 2014) 等作物 Msr 的功能研究表明, Msr 对于植物果实发育、适应生物胁迫及非生物胁迫方面表现出了积极的作用。但是茄子 *SmMsrA* 的功能尚无研究报道, 该基因在茄子果实发育和抵抗非生物胁迫过程中的调节作用尚不清楚。

病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 技术是指带一段靶基因序列的 VIGS 重组病毒侵染植物, 引起植物同源基因沉默与表型变异, 进而通过表型变异进行基因功能分析的方法 (Ratcliff et al., 1997; Scofield et al., 2005; 张增艳 等, 2006), 已被广泛应用于植物基因功能分析 (Lu et al., 2003; Scofield et al., 2005; 张增艳 等, 2006)。其中基于烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 的 VIGS 载体被广泛用于茄科植物及其它植物的组织, 如根 (Valentine et al., 2004)、叶 (Liu et al., 2002; Brigneti et al., 2004; Liu et al., 2004)、花 (Ratcliff et al., 2001) 和果实 (Fu et al., 2005, 2006; Zhu et al., 2006) 的基因功能研究。利用 TRV 病毒载体已成功在茄子上沉默与叶绿素合成相关的基因 (Liu et al., 2012), 但未见 VIGS 用于茄子果实生长发育相关基因的功能分析。

本研究中以茄子单性结实品系 D-10 为材料, 利用 Gateway 同源重组技术 (Hartley et al., 2000; Karimi et al., 2007) 构建 *SmMsrA* 基因 3 个插入片段的 VIGS 表达载体。通过对 TRV 病毒诱导 *SmMsrA* 基因的沉默效果分析, 鉴定 *SmMsrA* 与茄子果实发育的相关性, 以期为茄子单性结实基因的利用和研究茄子单性结实形成的分子机制提供理论依据, 并为茄子功能基因组学研究提供技术平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以茄子单性结实品系 D-10 为植物材料, 所有的材料均种植在温室中, 生长条件为: 昼夜温度分别为  $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$  和  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 60% ~ 75%。

RNA 提取、cDNA 第一链合成试剂盒及 *pEASY-Blunt* 载体均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均购自上海捷瑞生物工程有限公司, *Phusion*<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Kit 购自 NEB。pENTR<sup>™</sup> Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning Kits 和 Gateway<sup>®</sup> LR Clonase Enzyme Mix 购自美国

Invitrogen 公司。含 pTRV1、pTRV2、pTRV2-PDS 质粒的农杆菌 GV3101, pTRV2 空载 (适合 Gateway LR 反应, 抗卡那霉素和氨苄青霉素) 均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所加工番茄课题组提供。引物由北京诺赛基因生物公司合成, 测序由北京华大生物有限公司完成。

1.2 *SmMsrA* 基因的克隆

取开花当天的子房提取总 RNA, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 利用微量分光光度计法测定其浓度和纯度。选取高质量的 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。根据 NCBI 中茄子 *SmMsrA* 基因 (NCBI 登录号 JN663890) cDNA 序列设计引物 *SmMsrA* (表 1), 扩增 *SmMsrA* 基因的 CDS 全长。根据 Phusion® High-Fidelity PCR Kit 说明书, 以合成的 cDNA 为模板进行平末端 PCR 扩增, 体系为 50  $\mu$ L, 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物经电泳检测回收后, 连接到 *pEASY-Blunt* 载体, 转入大肠杆菌中。蓝白斑筛选后挑取阳性克隆送至北京华大生物技术有限公司测序。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物 Primer name	序列 Sequence (5' - 3')	片段大小/bp Sequence size
<i>SmMsrA</i>	SmMsrA-F	ATGGCTTCCAAAGAAGAGG	600
	SmMsrA-R	TCAACCGTAGCACCTTATTG	
<i>SmMsrAi1</i>	SmMsrAi1-F	CACCATGGCTTCCAAAGAAGAG	597
	SmMsrAi1-R	ACCGTAGCACCTTATTGG	
<i>SmMsrAi2</i>	SmMsrAi2-F	CACCAAGCGACTCAACCACCAAT	442
	SmMsrAi2-R	ACCGTAGCACCTTATTGG	
<i>SmMsrAi3</i>	SmMsrAi3-F	CACCTGATGCTCAGGCTCAACT	205
	SmMsrAi3-R	ACCGTAGCACCTTATTGG	
<i>qSmMsrA</i>	qSmMsrA-F	GCAAGGGAATCAATGGAAGCT	174
	qSmMsrA-R	TATTGGGTCATTGCAGCCCT	
<i>Actin</i>	Actin-F	ATCCAGCCTTCACCATTCCTCA	150
	Actin-R	GGTCATCATCTCCGGTTTGC	
<i>TRV2</i>	TRV2-F	GTTACTCAAGGAAGCACGAT	
	TRV2-R	AACCTCAGACACGGATCTAC	
<i>RNA1</i>	RNA1-F	TTACAGGTTATTTGGGCTAG	647
	RNA1-R	CCGGGTTCAATTCCTTATC	
<i>RNA2</i>	RNA2-F	TACGACGAACCAAGGG	427
	RNA2-R	TGCGAAACTCAAATGCT	

1.3 插入片段与 TOPO 入门克隆载体的连接、转化

选取该基因开放阅读框 (ORF) 为插入片段 1, 引物为 *SmMsrAi1* (表 1), 用于沉默基因家族; 选取 ORF 中不包含基因家族保守序列的 80 ~ 597 bp 位置上大小为 442 bp 序列为插入片段 2, 引物为 *SmMsrAi2* (表 1); 选取 ORF 的 393 ~ 597 bp 位置上大小为 205 bp 序列为插入片段 3, 引物为 *SmMsrAi3* (表 1)。3 个插入片段上游引物 5'端添加 TOPO®克隆所必须的 4 个碱基 CACC。

以上述 *SmMsrA* 基因测序正确的胶回收产物为模板, 利用上述 3 对引物进行平末端 PCR 扩增。3 个 PCR 产物经电泳检测回收后分别与 pENTR™/D-TOPO®载体连接, 转化到大肠杆菌。构建的 3 个入门克隆载体分别命名为 pENTR™/D-*SmMsrAi1*、pENTR™/D-*SmMsrAi2* 和 pENTR™/D-*SmMsrAi3*。用上述 3 对引物和通用引物 M13 分别对构建的 3 个入门克隆载体进行菌液 PCR, 鉴定插入片段是否连接到载体中。将阳性克隆的菌液选用通用引物 M13 进行测序验证。

#### 1.4 LR 反应构建 VIGS 表达载体及农杆菌转化

LR 反应体系 4  $\mu\text{L}$ : 3 个入门克隆载体质粒各 2.2  $\mu\text{L}$  (约 200 ng) 分别与 pTRV2 质粒 (约 200 ng) 1  $\mu\text{L}$ , LR clonase enzyme mix 0.8  $\mu\text{L}$ 。25  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜后加入 2  $\mu\text{L}$  ProteinaseK (蛋白酶 K) solution, 37  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 终止 LR 反应。将 4  $\mu\text{L}$  反应液转化到大肠杆菌中。将转化菌液均匀涂布在含 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜后, 挑取单克隆于含有相同氨苄青霉素的 LB 液体培养基中震荡培养 6 ~ 8 h。

提取并纯化质粒, 以质粒为模板, 分别用载体引物 TRV2 (表 1) 和 3 个插入片段引物进行 PCR 验证, 将阳性克隆质粒选用引物 TRV2 送至北京华大生物技术有限公司测序。3 个表达载体分别命名为 pTRV2-SmMsrAi1、pTRV2-SmMsrAi2 和 pTRV2-SmMsrAi3。详细步骤如图 1 所示。

用热激转化法将 VIGS 表达载体分别转化到农杆菌 GV3101 中。用 3 个插入片段引物对转化农杆菌 GV3101 后的菌液进行 PCR, 并以 GV3101 感受态菌液作 PCR 对照; 检测为阳性的用于茄子农杆菌侵染。

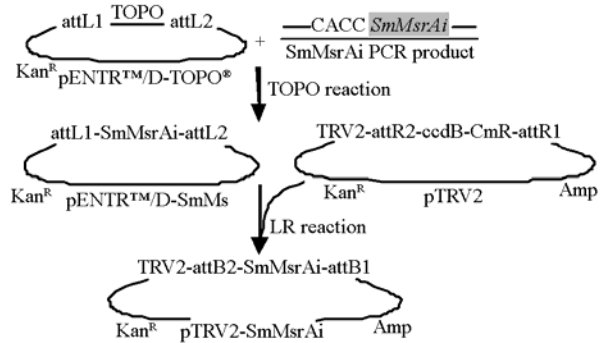


图 1 构建入门克隆载体 pENTR™/D-SmMsrAi 及 VIGS 表达载体 pTRV2-SmMsrAi 示意图

Fig. 1 Map of construct entry cloning vector pENTR™/D-SmMsrAi and VIGS expression vectors pTRV2-SmMsrAi

#### 1.5 农杆菌侵染

取含有 pTRV1、pTRV2: 00 (空载体)、pTRV2-PDS、pTRV2-SmMsrAi1、pTRV2-SmMsrAi2 和 pTRV2-SmMsrAi3 的农杆菌 GV3101 各 20  $\mu\text{L}$  涂布在 LB 固体培养基 (含 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平) 中, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 培养 36 ~ 48 h, 挑取单克隆于 5 mL 的 LB 液体培养基 (含有相同卡那霉素和利福平) 中, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜培养活化。当 OD<sub>600</sub> 的菌液浓度约为 0.8 时, 取 500  $\mu\text{L}$  的菌液转接到 50 mL 的 YEB 液体培养基 (含 500  $\mu\text{L}$  1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MES, 5  $\mu\text{L}$  200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 As 和 50  $\mu\text{L}$  50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素) 中, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜培养。记录下 OD<sub>600</sub> 时菌液浓度 X, 取 45 mL 菌液 4  $^{\circ}\text{C}$ , 4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 8 min 收集菌液, 加入 X 的 22 倍含 1 mL 的 200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  As 的新鲜 MMA 悬浮液 (1 L MMA 含 20 g sucrose, 5 g MS salt no vitamins, 1.95 g MES, pH 5.6), 重悬菌液置 OD<sub>600</sub> 为 1.0 ~ 2.0。分别将上述菌液与 pTRV1 菌液 1:1 混合, 室温静置 1 ~ 6 h 后侵染。用 5 mL 无针头注射器采用注射压迫法侵染茄子出芽 10 d 子叶展平的幼苗, 在两片子叶背部注射菌液, 使菌液充满整个子叶。处理植株为空白对照 (不处理)、pTRV2: 00 空载的阴性对照、含 pTRV2-PDS 载体的阳性对照及沉默基因的 3 个载体, 各处理 10 株, 设 3 次重复。用注射压迫法侵染茄子 6 周龄 4 ~ 5 片真叶幼苗, 侵染植株上部两片嫩叶, 处理植株同上。

#### 1.6 目的基因沉默效率分析

植株表型性状调查。侵染后 4 周, 通过比较光漂白或 TRV 病毒导致的花叶表型的植株数与接种 TRV 的总植株数的百分比评估基因沉默频率。开花后 20 d, 测量果实大小, 侵染植株的单性结实性参照刘富中等 (2005) 的方法鉴定。

*SmMsrA* 基因沉默的病毒分子检测。取侵染后 4 周各处理植株嫩叶提取总 RNA, 采用随机引物的方法合成第一链 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, 用特异引物 RNA1 和 RNA2 (表 1), PCR 扩增

TRV 病毒的 RNA1 和 RNA2, 检测 TRV 病毒。

*SmMsra* 基因沉默的 qRT-PCR 分析。为检测基因沉默的植株中内源性基因转录水平的表达量。取侵染后 6 周的阴性对照和沉默 *SmMsra* 基因的植株嫩叶；取各处理茄子开花前 2 d (– 2 d)、开花当天 (0 d)、开花后 4 d (4 d)、花后 10 d (10 d) 的子房和果实, 3 次重复, 提取总 RNA, 合成 cDNA 第一链。根据 *SmMsra* 基因 3 个插入片段设计荧光定量引物 q*SmMsra* (表 1)。以 *Actin* 基因为内参。使用仪器为 Roche Light Cycler480, 所有 PCR 反应均设 3 次重复, 体系为 10  $\mu$ L, 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 57  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环后作熔解曲线 (95 ~ 65  $^{\circ}$ C, 0.1  $^{\circ}$ C  $\cdot$  s $^{-1}$ ), 具体参考张映 (2011) 的方法。

使用 Excel 2010 软件处理数据, SPSS 软件进行显著性差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 茄子 *SmMsra* 基因的克隆

用引物 *SmMsra* 扩增出 *SmMsra* 基因的 CDS 全长序列, 测序结果与 NCBI 中 *SmMsra* 同源性的 100%, 验证扩增的片段即为 *SmMsra* 基因。

### 2.2 *SmMsra* 基因插入片段的克隆与 TOPO 入门克隆载体的连接鉴定

以测序正确的 *SmMsra* 基因序列为模板, 用设计的 3 对特异引物, 经 PCR 扩增获得 3 个插入片段。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测与预期大小一致。

用 3 对特异引物 *SmMsra*i 对构建的 3 个入门克隆载体质粒进行 PCR 验证, 出现符合预期的 597、442 和 205 bp 的条带 (图 2, 泳道 1 ~ 3); 用通用引物 M13 对菌液 PCR 鉴定, 出现大约 800、650 和 400 bp 左右的条带 (图 2, 泳道 8 ~ 10); 以大肠杆菌感受态为对照, 用上述 4 对引物 PCR 鉴定不能扩增出目的条带 (图 2, 泳道 4 ~ 7)。测序结果完全正确, 表明已成功构建 3 个入门克隆载体。

### 2.3 VIGS 表达载体的构建及农杆菌转化

用引物 *SmMsra*i1、*SmMsra*i2 和 *SmMsra*i3 分别进行质粒 pTRV2-*SmMsra*i1、pTRV2-*SmMsra*i2 和 pTRV2-*SmMsra*i3 的 PCR 扩增, 出现符合预期的 597、442 和 205 bp 的条带 (图 3, 泳道 1 ~ 3); 用引物 TRV2 对上述 3 个质粒进行 PCR 扩增, 出现比插入片段大 200 bp 左右的条带 (图 3, 泳道 4 ~ 6); 分别用引物 TRV2 和插入片段的 3 对特异引物 *SmMsra*i 对质粒 pTRV2: 00 空载做 PCR (对照) 验证, 只有引物 TRV2 扩增出条带 (图 3, 泳道 7), 其余没有扩增出条带 (图 3, 泳道 8 ~ 10), 表明 pTRV2: 00 载体不能扩增出目的条带。测序结果正确, 表明 3 个插入片段的 VIGS 表达载体 pTRV2-*SmMsra*i1、pTRV2-*SmMsra*i2 和 pTRV2-*SmMsra*i3 构建成功。

构建好的病毒载体通过热激法转入农杆菌 GV3101 中用于侵染。用 3 对特异引物 *SmMsra*i 进行菌液 PCR 鉴定, 出现符合预期的 597、442 和 205 bp 的条带 (图 4, 泳道 1 ~ 3); 以农杆菌 GV3101

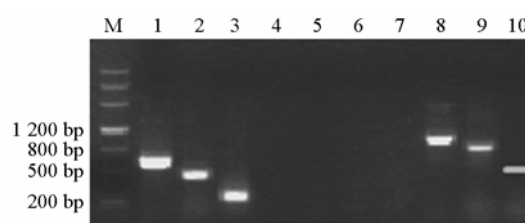


图 2 PCR 鉴定入门克隆 pENTR™/D-*SmMsra*i

M: Marker; 1、8: pENTR™/D-*SmMsra*i1;

2、9: pENTR™/D-*SmMsra*i2; 3、10: pENTR™/D-*SmMsra*i3; 4 ~ 7: 大肠杆菌感受态。

Fig. 2 PCR identify entry cloning pENTR™/D-*SmMsra*i

M: Marker; 1, 8: pENTR™/D-*SmMsra*i1;

2, 9: pENTR™/D-*SmMsra*i2; 3, 10: pENTR™/D-*SmMsra*i3;

4 - 7: Competent *Escherichia coli* cells.

感受态菌液（对照）进行 PCR，没有扩增出条带（图 4，泳道 4 ~ 6），说明农杆菌 GV3101 不能扩增出插入片段。表明 3 个 VIGS 表达载体成功转入到农杆菌 GV3101 中。

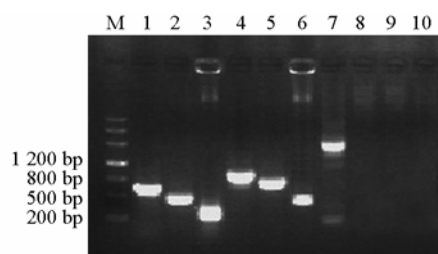


图 3 PCR 鉴定表达载体 pTRV2-SmMsrAi

Fig. 3 PCR identify expression vector pTRV2-SmMsrAi

M: Marker; 1, 4: Plasmid pTRV2-SmMsrAi1; 2, 5: pTRV2-SmMsrAi2; 3, 6: pTRV2-SmMsrAi3; 7 - 10: pTRV2: 00 empty vector.

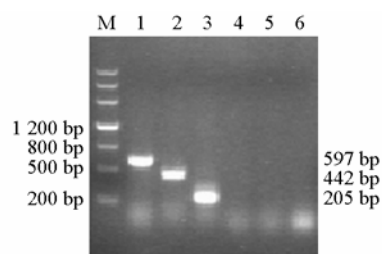


图 4 PCR 鉴定 pTRV2-SmMsrAi 转入农杆菌 GV3101

Fig. 4 PCR identify pTRV2-SmMsrAi transferred into *Agrobacterium*

M: Marker; 1, 2, 3: pTRV2-SmMsrAi1, pTRV2-SmMsrAi2 and pTRV2-SmMsrAi3; 4 - 6: *Agrobacterium* strain GV3101.

## 2.4 *SmMsrA* 基因的沉默效果

### 2.4.1 表型性状

农杆菌侵染 3 周后，pTRV2-PDS 植株新生叶片开始呈现光漂白现象，侵染 4 ~ 6 周后光漂白现象明显（图 5，A、B），先在叶柄处出现，随后由叶脉扩散到叶片，部分叶片几乎全部白化，有两株整株全白，之后死亡。这种光漂白现象持续了 3 个多月（图 5，C），侵染 4 个月后，在植株基部新萌发的侧枝还呈现出光漂白现象（图 5，D），表明植株的 *PDS* 基因被成功沉默，且 TRV 病毒载体的侵染效率非常高，病毒诱导的基因沉默期可达 4 个月之久。农杆菌介导侵染 pTRV2: 00 空载和 pTRV2-SmMsrAi 载体病毒的植株 4 周后，新生叶片出现病毒斑（图 5，F ~ H），该病毒斑同样是先在叶柄处出现，随后由叶脉扩散到叶片；与空白对照（图 5，E）相比，叶色发黄，叶片和植株较小。

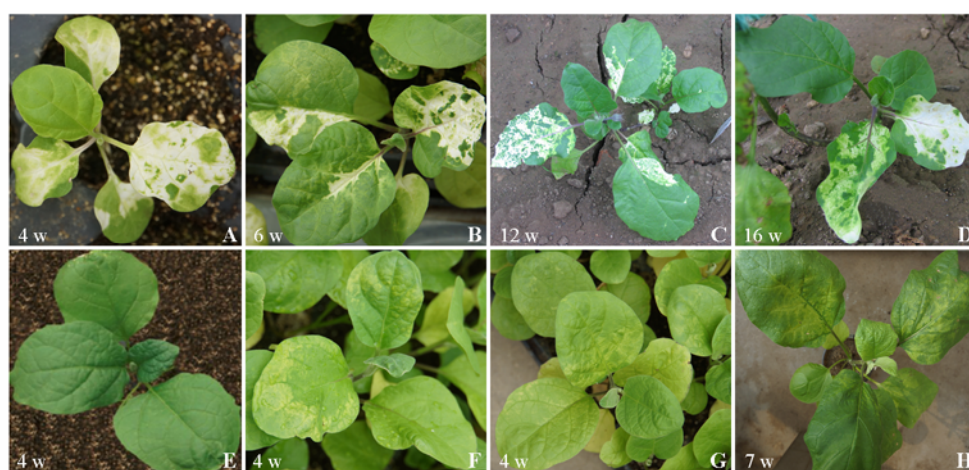


图 5 VIGS 沉默表型鉴定

A ~ D: 侵染 pTRV2-PDS; E: 空白对照; F: pTRV2: 00 阴性对照; G: 侵染 pTRV2-SmMsrAi3; H: 侵染 pTRV2-SmMsrAi2。

Fig. 5 VIGS silence phenotypic characterization

A - D: Infected pTRV2-PDS; E: Blank control; F: pTRV2: 00 negative control; G: Infected pTRV2-SmMsrAi3; H: Infected pTRV2-SmMsrAi2.

侵染后 4 周, 与空白对照相比, pTRV2: 00 阴性对照的花叶 (图 5, F) 频率为 87.5%; pTRV2-PDS 阳性对照, 沉默 *PDS* 基因叶片产生的光漂白现象的频率为 87.5%; 沉默 *SmMsra* 基因的插入片段 *SmMsra*i1、*SmMsra*i2 和 *SmMsra*i3 产生花叶的频率分别为 56.25%、62.5%和 68.75%, 表明 *SmMsra*i3 沉默频率最高。

侵染茄子 6 周龄 4 ~ 5 片真叶幼苗的处理与对照相比, 沉默 *PDS* 和 *SmMsra* 基因均没有明显表型差异。推测侵染时植株较大, 叶片较硬, 而且植株抗病毒侵染的性能增强, 侵染的菌量相对整个植株较少, 导致菌量不能达到基因沉默的量。

表 2 数据分析表明, 与未处理的空白对照和阴性对照 (pTRV2: 00) 相比, 沉默片段 2 和 3 侵染的 D-10 植株的果实纵径和横径显著减小, 表明 *SmMsra* 基因沉默后果实发育受到影响, 果实变小, 沉默效果比较显著。侵染沉默片段 1 的植株果实大小与空白对照和阴性对照相比, 无显著变化, 这可能是沉默片段较大, 导致沉默效果不明显。与未处理的空白对照相比, 侵染病毒植株果实的无籽果率均不同程度提高, 且极显著高于空白对照; 沉默片段 1 和 3 的 D-10 植株果实的无籽果率显著低于阴性对照, 而沉默片段 2 果实的无籽果率与阴性对照相比无差异, 表明 *SmMsra* 基因沉默后对果实单性结实性没有影响, 无籽果率的上升可能是由于病毒的侵染所致。

2.4.2 分子检测

以合成的 cDNA 为模板, 用 TRV 的特异引物进行 PCR 扩增。结果表明, 只有未侵染 TRV 病毒的茄子植株叶片中没有检测出 TRV 病毒 RNA1 和 RNA2 的特异性条带, 侵染病毒的茄子植株叶片中均能检测到病毒 RNA1 和 RNA2 的特异性条带 (图 6), 说明 TRV 已成功侵入茄子植株中, 并在植株内复制、转移和表达。

表 2 侵染植株的果实性状

Table 2 Infect plant fruit characters

处理 Teast	果实纵径/mm Length	果实横径/mm Diameter	无籽果率/% Rate of seedless
空白对照 Blank control	37.08 aA	47.00 aA	70 dC
pTRV2: 00	33.54 abAB	44.63 aA	90 aA
pTRV2-SmMsraI1	34.58 abAB	42.74 aAB	77 cB
pTRV2-SmMsraI2	30.72 bB	36.42 bBC	91 aA
pTRV2-SmMsraI3	29.85 bB	34.61 bBC	85 bA

注: 表中同一栏中不同小写字母表示数据差异显著 ( $\alpha = 0.05$ ), 不同大写字母表示数据差异极显著 ( $\alpha = 0.01$ )。

Note: Means followed by different lowercase letters indicate significant difference ( $\alpha = 0.05$ ), means followed by different lowercase capital letters indicate fearfully significant difference ( $\alpha = 0.01$ ).

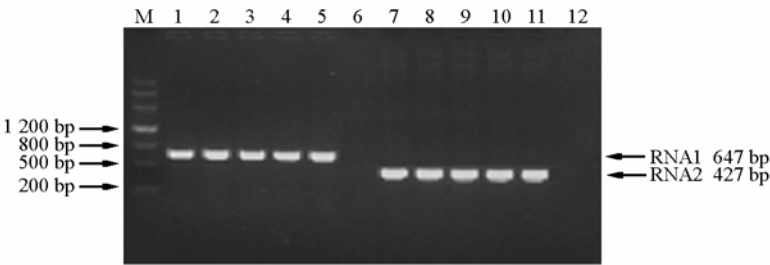


图 6 茄子植株中 TRV 病毒 RNA1 和 RNA2 的检测

M: Marker; 1、7: 沉默 *SmMsra*i1 植株; 2、8: 沉默 *SmMsra*i2 植株; 3、9: 沉默 *SmMsra*i3 植株;  
4、10: 阴性对照植株 (pTRV2: 00 空载); 5、11: 阳性对照 (pTRV2-PDS); 6、12: 空白对照。

Fig. 6 TRV virus RNA1 and RNA2 detection in eggplant

M: Marker; 1, 7: Silencing the *SmMsra*i1 in plants; 2, 8: Silencing the *SmMsra*i2 in plants; 3, 9: Silencing the *SmMsra*i3 in plants;  
4, 10: Negative control in plant (pTRV2: 00 empty vector); 5, 11: Positive control in plant (pTRV2-PDS); 6, 12: Blank control.

### 2.4.3 qRT-PCR 检测 *SmMsrA* 基因表达量

利用 qRT-PCR 技术对不同沉默植株 *SmMsrA* 基因转录物的表达水平进行相对定量分析, 结果表明, 侵染后 6 周, D-10 叶片中该基因的表达量明显降低, 其中 *SmMsrAi3* 的沉默效果最好, 其表达量是阴性对照的 36%, 其他两个沉默片段分别为阴性对照的 50% 和 43% (图 7)。果实不同发育时期 *SmMsrA* 的相对表达量均不同程度下降, *SmMsrAi3* 相对表达量是对照的 39%, 沉默效果最好 (图 8)。

以上分析表明, *SmMsrA* 基因的 mRNA 在沉默该基因的茄子叶片和果实中被显著降解, 证明构建的茄子 VIGS 体系能有效降低茄子植株叶片和果实中的内源 *SmMsrA* 基因转录水平的表达量。

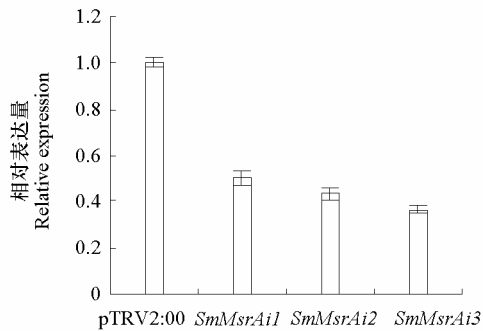


图 7 不同处理的叶片中 *SmMsrA* 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *SmMsrA* in different treatments' leaves

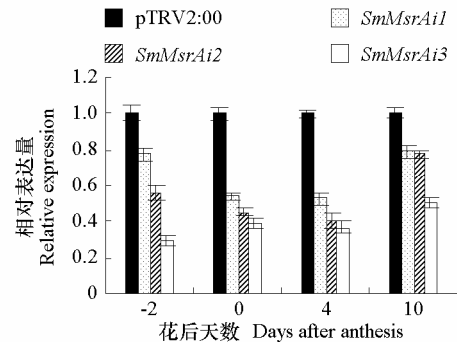


图 8 不同时期果实中 *SmMsrA* 基因的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *SmMsrA* in different fruit periods

## 3 讨论

影响 VIGS 体系建立的因素有病毒载体、插入的目的基因片段、环境条件、侵染方法和苗龄等。本研究中构建了基于 TRV 的 VIGS 表达载体, 进行侵染试验并获得成功, 沉默时间可达 4 个月, 证实了 TRV 是效率和持久性较好的病毒载体 (Zheng et al., 2010)。本研究中插入的 *SmMsrA* 基因片段大小为 200 ~ 600 bp, *SmMsrA* 表达量明显降低, 以 205 bp 的 *SmMsrAi3* 沉默效果最佳; 插入的 *PDS* 报告基因大小为 200 bp, 获得了明显的光漂白表型, 进一步证实了沉默片段大小为 200 bp 左右时沉默效果最好, 这与前人的研究结果 (Thomas et al., 2001; Burch-Smith et al., 2004; 张新华和李富军, 2012) 相同。可能是由于插入片段的长度对病毒在植物细胞间运动有限制, 较短的插入序列有利于病毒在植物细胞间运动 (张新华和李富军, 2012)。温度是影响 VIGS 沉默效果的最重要的环境因子之一, 因植物种类不同, 有效沉默的温度要求也不同。番茄较好的沉默表型在 21 °C 或更低的温度下发生 (Liu et al., 2002; Burch-Smith et al., 2004), 本氏烟适宜的温度在 25 °C 左右 (Burch-Smith et al., 2004; Nethra et al., 2006)。本研究中发现, 在 20 ~ 25 °C 进行茄子的 VIGS 侵染, 可产生有效的沉默效果。

Liu 等 (2012) 用高压喷射法和注射压迫法侵染茄子四周龄幼苗, 结果表明高压喷射法侵染的沉默效果较好。本研究中用注射压迫法侵染茄子 10 d 左右幼苗子叶, 得到的沉默效果明显, 而用相同方法侵染 6 周龄幼苗真叶, 没有沉默表型。这表明茄子 VIGS 侵染沉默效果与侵染方法和侵染的植株苗龄大小有关。苗龄大的植株叶片纤维化明显, 注射压迫法由于压力较小, 接种菌液渗透慢、菌液不易渗透到叶片组织中, 导致渗透到叶片中的菌量较少, 最终因接种菌量不能达到基因沉默的

量, 导致没有沉默表型或沉默效果不明显, 因此, 苗龄较大的茄子植株适合用高压喷射法侵染。茄子子叶纤维少, 用注射压迫法侵染子叶, 菌液很快扩散到整个子叶, 需要的菌量较少, 且比高压喷射法操作简单; 试验表明, 植株侵染后一个月左右才会引起基因沉默, 用注射压迫法侵染幼苗子叶 10 d 左右, 可以更快速的得到沉默表型, 进行下一步基因功能的鉴定。

张映等 (2011) 克隆了多胺合成过程中的茄子甲硫氨酸亚砷还原酶基因 (*SmMsrA*) 的 cDNA 全长, 初步分析其在单性结实品系子房中上调表达。李艳玮 (2013) 进一步研究茄子单性结实果实发育中内源多胺含量的变化表明, 茄子果实发育初期较高的多胺水平有利于茄子果实发育和单性结实。本研究利用基于 TRV 诱导的基因瞬时沉默技术降低了 *SmMsrA* 基因在 D-10 叶片和果实中的转录水平, 果实大小鉴定结果也表明, *SmMsrA* 基因表达沉默的 D-10 果实显著小于空白对照和阴性对照, 证明 *SmMsrA* 基因是正向调控茄子果实发育的重要基因。

茄子单性结实品系 D-10 的单性结实特性在低温诱导下表达 (刘富中 等, 2005), 由于 VIGS 方法具有目标基因沉默不能遗传、沉默表型受温度影响等缺点, 无法准确在低温条件下对其单性结实特性进行研究。今后将通过转基因技术创制可以稳定遗传的目标基因过表达的转基因茄子, 进行两代以上的功能研究, 才能深入了解 *SmMsrA* 基因的功能和作用机制及是否与单性结实相关。

本研究中运用 Gateway 技术成功构建了茄子烟草脆裂病毒 (TRV) 的 VIGS 表达载体, 用农杆菌介导的注射压迫法侵染茄子子叶, 成功沉默 *SmMsrA* 基因在叶和果实中的表达, 为利用 VIGS 技术快速鉴定茄子基因的功能奠定了基础。

## References

- Bethcold U, Murphy D J, Mullineaux P M. 2004. *Arabidopsis* peptide methionine sulfoxide reductase2 prevents cellular oxidative damage in long nights. *The Plant Cell*, 16 (4): 908 - 919.
- Brigneti G, Martin-Hernandez A M, Jin H, Chen J, Baulcombe D C, Baker B, Jones J D. 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J*, 39: 264 - 272.
- 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 J*, 39 (5): 734 - 746.
- Dai Changbo, Wang Myeong-Hyeon. 2012. Characterization and functional analysis of methionine sulfoxide reductase A gene family in tomato. *Molecular Biology Reports*, 39 (5): 6297 - 6308.
- DellaPenna D, Lincoln J E, Fischer R L, Bennett A B. 1989. Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit. *Plant Physiol*, 90: 1372 - 1377.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Jiang W B, Luo Y B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J*, 43: 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. *Mol Cells*, 21: 153 - 160.
- Guo Xiao-li, Wu Yao-rong, Wang Yi-qin, Chen Yan-min, Chu Cheng-cai. 2009. *OsMSRA4.1* and *OsMSRB1.1*, two rice plastidial methionine sulfoxide reductase, are involved in abiotic stress responses. *Planta*, 230: 227 - 238.
- Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. 2000. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res*, 10: 1788 - 1795.
- Karimi M, Depicker A, Hilson P. 2007. Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol*, 145 (4): 1144 - 1154.
- Li Xiang. 2014. Molecular characterization and physiological function of methionine sulfoxide reductase gene family in wheat [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 李 翔. 2014. 小麦甲硫氨酸亚砷还原酶基因家族的分子鉴定与生理功能研究[博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Li Xiang-jing, Liu Fu-zhong, Zhang Ying, Li Yan-wei, Chen Yu-hui, Lian Yong. 2012. Research progress on eggplant parthenocarpy. *China Vegetables*, (6): 8 - 14. (in Chinese)
- 李香景, 刘富中, 张 映, 李艳玮, 陈钰辉, 连 勇. 2012. 茄子单性结实研究进展. *中国蔬菜*, (6): 8 - 14.

- Li Yan-wei, Liu Fu-zhong, Chen Yu-hui, Zhang Ying, Zhang Wei-wei, Lian Yong. 2013. Effect of temperature on endogenous hormones contents during parthenocarpic eggplant ovary (fruit) development. *China Vegetables*, (22): 32 – 38. (in Chinese)
- 李艳玮, 刘富中, 陈钰辉, 张映, 张伟伟, 连勇. 2013. 温度对茄子单性结实子房 (果实) 发育过程中内源激素含量的影响. *中国蔬菜*, (22): 32 – 38.
- Liu Fu-zhong, Lian Yong, Chen Yu-hui, Song Yan. 2005. The effect of temperature and bud stage treatment on parthenocarpic gene expression of eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1021 – 1025. (in Chinese)
- 刘富中, 连勇, 陈钰辉, 宋燕. 2005. 温度和蕾期去雄及去柱头处理对茄子单性结实性的影响. *园艺学报*, 32 (6): 1021 – 1025.
- Liu Hai-ping, Fu Da-qi, Zhu Ben-zhong, Yan Hua-xue, Shen Xiao-ying, Zuo Jin-hua, Zhu Yi, Luo Yun-bo. 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 J*, 31: 777 – 786.
- Liu Y, Nakayama N, Schiff M, Litt A, Irish V F, Dinesh-Kumar S P. 2004. Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol*, 54: 701 – 711.
- Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30: 296 – 303.
- Nethra P, Nataraja K N, Rama N, Udayakumar M. 2006. Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus. *Current Science*, 3: 431 – 435.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, 25 (2): 237 – 245.
- Ratcliff F, Harrison B D, Baulcombe D C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276 (5318): 1558 – 1560.
- Romero H M, Berlett B S, Jensen P J, Pell E J, Tien M. 2004. Investigations into the role of the plastidial peptide methionine sulfoxide reductase in response to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136 (3): 3784 – 3794.
- Scofield S R, Huang L, Brandt A S, Bikram S G. 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 Physiol*, 138: 2165 – 2173.
- Thomas C L, Jone 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.
- Valentine T, Shaw J, Blok V C, Phillips M S, Oparka K J, Lacomme C. 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiol*, 136: 3999 – 4009.
- Zhang Xin-hua, Li Fu-jun. 2012. Research advances of virus-induced gene silencing technology in plant. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 32 (2): 419 – 424. (in Chinese)
- 张新华, 李富军. 2012. 病毒诱导的基因沉默技术及其在植物中的研究进展. *西北植物学报*, 32 (2): 419 – 424.
- Zhang Ying. 2011. Construction of parthenocarpic SSH cDNA libraries and parthenocarpic related genes cloning in eggplant [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 张映. 2011. 茄子单性结实抑制差减文库的构建和相关基因的克隆 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Zhang Ying, Chen Yu-hui, Zhang Zhen-xian, Fang Zhi-yuan, Lian Yong, Liu Fu-zhong. 2011. cDNA cloning and characterization of an 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. 2011. 茄子甲硫氨酸亚砜还原酶 (*SmMsra*) 基因 cDNA 全长的克隆和分析. *园艺学报*, 38 (8): 1469 – 1478.
- Zhang Zeng-yan, Yao Wu-lan, Xin Zhi-yong. 2006. Advance in virus-induced gene silencing, a novel powerfully tools for functional analysis of plant genes. *Plant Genet Resour*, 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.
- Zheng S J, Snoeren T A L, Hogewoning S W, van Loon Joop J A, Dicke Marcel. 2010. Disruption of plant carotenoid biosynthesis through virus-induced gene silencing affects oviposition behaviour of the butterfly *Pieris rapae*. *New Phytologist*, 186 (3): 733 – 745.
- Zhu H L, Zhu B Z, Shao Y, Wang X G, Lin X J, Xie Y H, Li Y C, Gao H Y, Luo Y B. 2006. Tomato fruit development and ripening are altered by the silencing of *LeEIN2* gene. *J Integr Plant Biol*, 48: 1478 – 1485.