

# 亚麻病毒诱导的基因沉默体系初探

陆旭鹏<sup>1</sup>, 李世玉<sup>1</sup>, 戴志刚<sup>2</sup>, 袁红梅<sup>3</sup>, 钱雨康<sup>1</sup>, 粟建光<sup>2</sup>, 孙健<sup>1</sup>, 谢冬微<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南通大学生命科学学院, 江苏 南通

<sup>2</sup>中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙

<sup>3</sup>黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨

Email: \*xiedongwei@163.com, 1282246540@qq.com

收稿日期: 2021年6月13日; 录用日期: 2021年7月7日; 发布日期: 2021年7月14日

## 摘要

为研究烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)介导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术是否适合在亚麻上应用, 以PDS (Phytoene desaturase, 八氢番茄红素脱氢酶)为标记基因, 通过构建基因沉默载体, 在亚麻品种大紫花中建立了TRV-VIGS体系。结果显示, pTRV2-PDS侵染植株真叶表现出明显的沿叶脉方向延伸的条状白化症状, 且qRT-PCR分析发现与野生型及pTRV2空载体植物相比, pTRV2-PDS侵染的植株中PDS基因的表达均被有效抑制。证明, TRV介导的VIGS可以用于亚麻基因功能的验证研究。

## 关键词

亚麻, 基因沉默, 烟草脆裂病毒, TRV-VIGS, PDS

# The Technology System Preliminary Study of VIGS on Flax

Xupeng Lu<sup>1</sup>, Shiyu Li<sup>1</sup>, Zhigang Dai<sup>2</sup>, Hongmei Yuan<sup>3</sup>, Yukang Qian<sup>1</sup>, Jianguang Su<sup>2</sup>, Jian Sun<sup>1</sup>, Dongwei Xie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, Nantong University, Nantong Jiangsu

<sup>2</sup>Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha Hunan

<sup>3</sup>Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin Heilongjiang

Email: \*xiedongwei@163.com, 1282246540@qq.com

Received: Jun. 13<sup>th</sup>, 2021; accepted: Jul. 7<sup>th</sup>, 2021; published: Jul. 14<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

In order to study whether tobacco rattle virus (TRV)-mediated virus induced gene silencing (VIGS)

\*通讯作者。

文章引用: 陆旭鹏, 李世玉, 戴志刚, 袁红梅, 钱雨康, 粟建光, 孙健, 谢冬微. 亚麻病毒诱导的基因沉默体系初探[J]. 植物学研究, 2021, 10(4): 499-506. DOI: 10.12677/br.2021.104063

technology is suitable application for flax, a TRV-VIGS system is established by constructing a gene silencing vector with phytoene desaturase (*PDS*) as a marker gene. The results showed that qRT-PCR analysis showed that the expression of *PDS* gene in pTRV2-*PDS* infected plant is effectively inhibited compared with the control and empty plant, and the euphylla showed obvious albinism. The results showed that VIGS mediated by TRV could be used to verify the function of flax gene.

## Keywords

Flax, Gene Silencing, Tobacco Rattle Virus, TRV-VIGS, *PDS*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是我国重要的经济作物。长期以来, 亚麻育成品种主要依靠常规育种方法, 针对性较差, 育种年限长, 并且由于表型鉴定困难, 常规育种很难选育出纤维品质好、富含某种功能营养成分的新品种。因此, 应从分子育种方向入手, 挖掘相关候选基因, 深入验证基因功能, 开发功能分子标记, 早日实现营养品质和纤维品质俱佳的亚麻新品种的定向培育。相比于拟南芥、水稻、小麦等模式植物和主粮作物, 亚麻分子生物学研究起步较晚, 其目前基因功能的验证载体主要以拟南芥和烟草为主。

病毒介导的基因沉默(Virus Induced Gene Silencing, VIGS)技术, 指的是一类将成功导入目的基因片段的重组病毒载体, 通过农杆菌转化或其他的方法途径, 导入目的植株或其特定部位, 从而实现抑制该植株或部位的内源基因表达的技术。首先, VIGS 技术可以应用于对植物抗病、虫和逆性等相关基因的研究中。目前已经利用该技术成功地鉴定了许多对病毒、细菌、害虫有效的抗性基因, 并且, 某些与植物的抗逆性有关的途径中关键基因的功能也已经通过这项技术实现了鉴定和验证, 例如之前就有过利用 TRV 对本氏烟草中 Rx 基因介导的细胞程序性凋亡的作用的相关研究的例子。VIGS 技术也有可用于抗真菌病害研究的例子: 目前已经通过 VIGS 技术在对番茄与叶霉病菌之间相互作用的研究中实现了突破, 并且也实现了通过该技术来鉴定某些与叶霉病抗性相关基因的目标[1]。众所周知, 对植物抗逆性的研究可以说是国内外植物、农作物研究的一大研究热点话题和重点方向, 因而运用 VIGS 技术进行抗逆性研究的例子简直数不胜数。如 VIGS 技术应用在对番茄耐旱基因(SLB9 基因)的功能研究中[2]; 利用 VIGS 技术进行了对 GhSDH1-1 基因能够正向调控棉花对黄萎病抗性机制的研究[3]及用 VIGS 技术进行了 GhCOI1 和 GhMYC2 基因对棉花黄萎病抗性的研究[4]; 对棉花 VIGS 病毒载体的构建, 并将其应用在抗病基因功能鉴定上[5]。目前 VIGS 技术以在植物的胞内生化、生物代谢有关基因作用的研究最为突出, 并且涉及到植物胞内许多必需物质的合成代谢, 甚至是植物细胞内的某些微小细胞器的合成代谢相关基因的研究。例如, 目前对辣椒素、木质素[6]等的合成相关基因的鉴定也正是通过 VIGS 技术来实现的。

本研究以亚麻为实验材料, 利用农杆菌进行侵染, 进而探索亚麻幼苗病毒诱导基因沉默(VIGS)的最优体系, 通过观察亚麻幼苗叶片是否出现条状白化, 从而判断其内源指示基因(*PDS* 基因)的表达是否受到有效抑制。本研究对亚麻 VIGS 体系的初探, 将会为亚麻功能基因验证奠定良好的基础。

## 2. 材料方法

### 2.1. 材料

试验采用亚麻品种为大紫花,由南通大学生命科学学院提供。播种采用草炭土与蛭石的混合土壤(体积比 2:1),幼苗在光照培养箱中培养,培养条件模拟自然生长环境。光照时长 16 h,黑暗时长 8 h,循环交替,温度 24°C/18°C,湿度 50%。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. PDS 片段扩增

提取亚麻嫩叶总 RNA 并反转录成 cDNA。以八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene desaturase, *PDS*)基因 mRNA 序列为参考序列,利用 Primer 5 软件设计特异引物,经琼脂糖凝胶电泳后收集 PCR 产物,胶回收的产物进行测序验证,利用 PCR 纯化试剂盒(天根)纯化,然后将纯化后的产物克隆到 TRV2 载体上,并进行测序。

提取含 TRV2 的菌液质粒,利用 Bam HI 和 Eco RI 酶切 pTRV2 质粒和 *PDS* 片段,将 *PDS* 片段与双酶切后质粒由 T4 DNA 连接酶进行连接,载体连接成功后命名为 pTRV2-PDS。将 pTRV2-PDS 载体转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态中,经菌液 PCR 鉴定。将含 pTRV2-PDS 重组载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌液与 TRV2-PDS 重组载体分别导入农杆菌中,−20°C 备用。

#### 2.2.2. 侵染亚麻幼苗

首先,我们取在光照 16 h 暗 8 h 条件下生长的幼苗,在其刚长出两片子叶时(约播种后 15 d 左右)准备摇菌。在接种前 48 h 左右,将 pTRV1, pTRV2, pTRV2-PDS 挑取单菌落,加 1 ml YEB 液体培养基(YEB 培养基需加卡纳至终浓度为 10 mg/ml;利福平终浓度为 50 mg/ml),然后 28°C 200 rpm 过夜培养,这一步的目的是将三种载体分别导入农杆菌 GV1301 感受态中。

接种前一天菌液 PCR 检测,鉴定菌株并未丢失目标基因。将摇好的菌倒入含有 25 ml YEB 液体培养基中(无需加卡纳、利福平),接着 28°C 200 rpm 摇一晚大约 16 h。接种注射前,测出菌液的 OD 值,用来确定重悬时所加 YEB 培养基的体积:将菌液收集于 50 ml 离心管中,7000 rpm 离心 5 min,去上清液,用液体 YEB 培养基(无需加卡纳、利福平)重悬菌液使 OD 值达到 1 左右(0.6 < OD < 1.2)。菌液中需加入三种药品使终浓度分别为 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MES; 150 u MAS。漩涡震荡后可以室温静置 3 h 或者 28°C 200 rpm 摇 1 h。将摇好的 pTRV1 与 pTRV2-PDS 等体积混匀, pTRV1 与 pTRV2 等体积混匀(pTRV1 每次都需多摇一些)混匀好的菌液分别用来注射。

注射时应选择子叶背面用 1 ml 注射器针头扎 3 个孔,这一步的关键是不能扎透子叶。用注射器去掉针头吸取混好的菌液,向子叶背面的针眼里推,不能过于用力,否则苗易死亡,菌液量无需过多,部分晕染扩散变绿即可。注射完立即注明注射日期和菌液名称。最后暗处培养 24 h 之后移置光照培养箱中培养(光周期 16 h/8 h,温度 24°C/18°C 交替)。

#### 2.2.3. qRT-PCR 验证

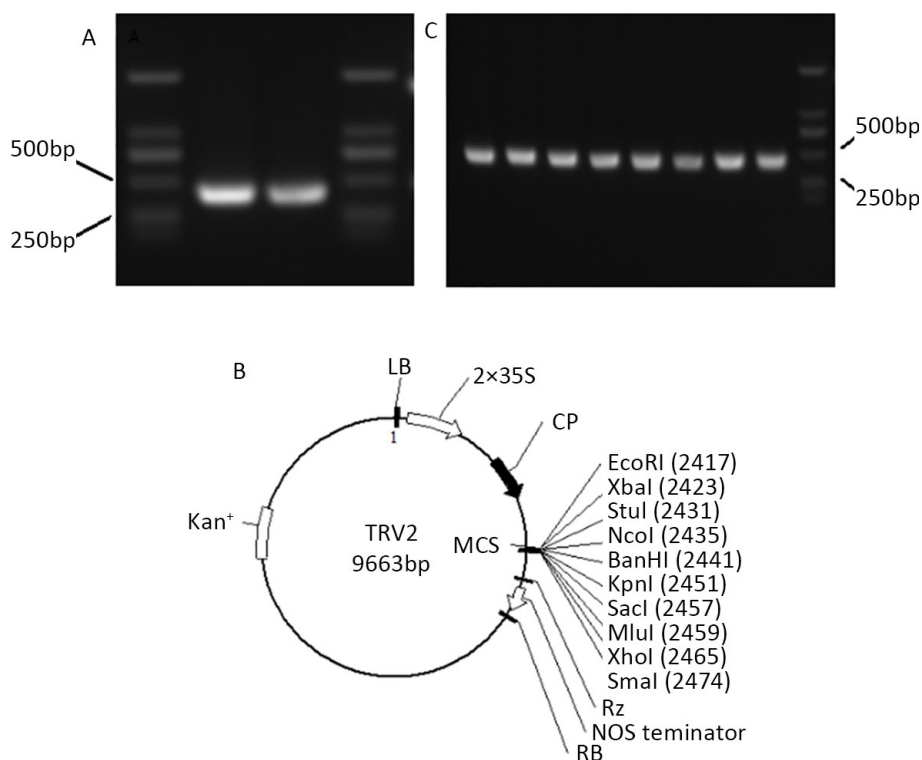
当侵染 pTRV2-PDS 的亚麻植株出现第一对真叶稳定白化现象时(接菌后约一周),取野生型、pTRV2 空载、pTRV2-PDS 干扰植株上完整嫩叶,样品置于液氮中保存,随后提取样品 RNA 并反转录为 cDNA,进行 qRT-PCR 检验,引物(上游引物序列:CGGGATCCGCACTAACTTCATTAATCC,下游引物序列:GCTCTAGACTTTAGTTTCCGGTCAAACC),选用亚麻 Actin-7 基因(上游引物序列:ATTGGTGCTGAGAGGTTCCG,下游引物序列:CGGGAAACAGACAGGACACT, GeneBank 登录号:NM\_001308447)作为

内参基因。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : cDNA 加入 3  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物及 50  $\times$  ROX ReferenceDye 1 各加入 0.5  $\mu\text{L}$ , qPCR SYBR Green MasterMix 加入 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 加入 5.5  $\mu\text{L}$ , 体系补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序设置为: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$  运行 6 min, 变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$  运行 10 s, 特异性引物退火温度 58 $^{\circ}\text{C}$  运行 20 s, 延伸温度 72 $^{\circ}\text{C}$  运行 15 s, 40 次循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min。PCR 结果以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法[7]计算基因的相对表达量, 以此检验沉默植株基因被沉默的效率。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 目的片段(*PDS*)扩增和载体的构建

经改造的 pTRV2 基因沉默载体作为本试验所用载体, *Lus10021967* (*PDS*)基因从亚麻中克隆, 开放阅读框全长 437 bp (图 1A), 根据亚麻 *PDS* 基因的非保守序列分别在两端添加两个酶切位点, Xba I 和 Bam HI (图 1B)。PDS 基因序列和 pTRV2 沉默载体经双酶切(Xba I 和 Bam HI)后连接组成 pTRV2-PDS 重组质粒, 转化至大肠杆菌。经过菌液 PCR 分析(图 1C)及对其测序, 筛选出阳性菌并提取质粒, 随后转化农杆菌并保存, 用于后续的侵染亚麻工作。



**Figure 1.** Schematic diagram of *PDS* gene amplification electrophoresis and vector construction in flax

**图 1.** 亚麻 *PDS* 基因扩增电泳及载体构建示意图

#### 3.2. 亚麻植株 *PDS* 基因干扰表型观察

白化的阳性亚麻植株是否出现可反映病毒诱导体系在亚麻植株中是否具有适用性。携带 pTRV2-PDS 重组质粒的病毒侵染亚麻子叶期植株, 我们观察到白化幼苗发生白化的部位基本一致(图 2)。阳性亚麻植株的白化部位出现在第一、二对真叶, 而野生型及空载对照植株表型正常(图 3A, 图 3B), 同时我们观察到个别侵染处理下的阳性白化植株因叶片组织受损而出现叶片畸形、皱缩、弯曲等非正常生长的现象。

结果表明子叶期亚麻白化部位出现在第一、二对真叶处(图 3D)。



**Figure 2.** Whole albino parts of pTRV2-PDS plants observed

**图 2.** pTRV2-PDS 植株的白化部位整体观察

亚麻植株培养 15 d 时, 接种 pTRV2-PDS 载体的亚麻植株新生嫩叶基部出现白化现象。之后多处叶片出现条状白化现象, 并非整个叶片全部白化, 仅是沿着叶脉方向延伸白化区域增多且现象明显(图 3C)。pTRV2-PDS 侵染植株作为指示植株, 白化现象表明重组质粒在植物体内表达, 但 pTRV2 空载植株表型与野生型植株并无明显差异(图 4)。





(A): 野生型植株叶片和茎; (B): pTRV2 空载体植株叶片和茎; (C): pTRV2-PDS 干扰植株叶片和茎; (D): pTRV2-PDS 干扰植株的完整植株

**Figure 3.** Phenotype of the TRV2-PDS-transformed plants.

**图 3.** 病毒干扰植株的表型细节图



**Figure 4.** Comparison of growth of wild-type and virus-infected plants

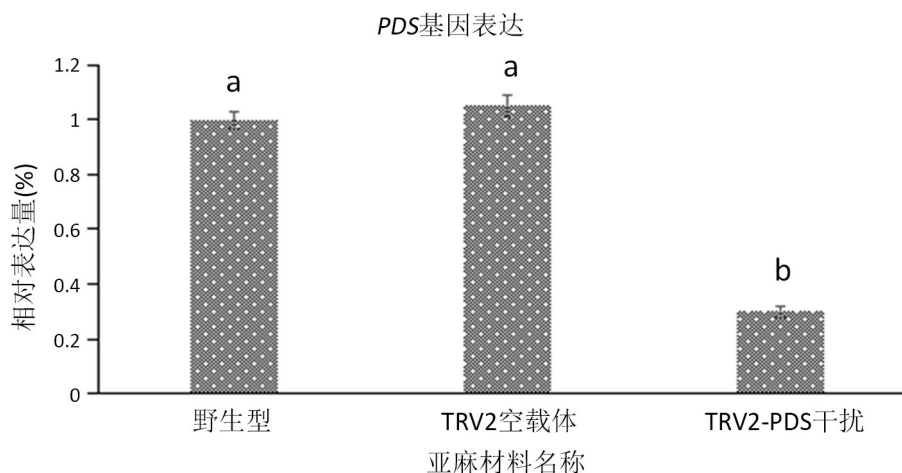
**图 4.** 野生型及病毒侵染植株的长势比较

### 3.3. 沉默效果验证

当第一对真叶出现白化，便对 pTRV2-PDS 干扰植株、pTRV2 空载植株、野生型植株检测 *PDS* 基因表达情况，结果如图 5 所示。pTRV2-PDS 干扰植株 *PDS* 基因沉默植株基因表达量低于野生型植株 70%，低于 pTRV2 空载植株 71.4%，证明亚麻 pTRV2-PDS 干扰植株中 *PDS* 基因被成功沉默。

## 4. 讨论

研究发现 TRV 病毒可侵染的寄主范围广，且其病毒传播速度非常快，但对所侵染植株的致病表现相对较弱，很少致死。并且其可在植物的生长点和分生组织内迅速扩散，因而导致特异性的目标基因被降解，因为以上的这些特点，其成为研究非模式植物基因功能较好的载体选择[8] [9]。与其他一些导致基因



**Figure 5.** *PDS* gene expression in flax  
**图 5.** 亚麻 *PDS* 基因表达量

功能丧失的沉默方法相比, VIGS 具有以下优点, 无需进行遗传转化、实验周期短和可在不同的遗传背景下进行基因功能研究等[10] [11]。然而, VIGS 技术也存在一定的缺陷, 其中 VIGS 技术在不同物种中的沉默效果差别较大, 对植物寄主的选择性限制 VIGS 技术在各物种中大范围使用。TRV 载体适用的植物范围与其他 VIGS 载体相比虽然较为广泛, 但是其是否在亚麻材料中适用尚无大量报道。本研究以 *PDS* 为标记基因, 通过构建基因沉默载体 pTRV2-*PDS*, 在亚麻品种大紫花中建立了 TRV-VIGS 体系。结果显示, qRT-PCR 分析发现与对照及空载体植物相比, TRV2-*PDS* 侵染的植株中 *PDS* 基因的表达均被有效抑制, 真叶表现出明显的白化症状。

近年来, VIGS 技术逐渐的在一些小众植物中得到应用, 但尚未能大规模的开展[12], 在亚麻中该体系的研究鲜有报道。基因能成功的沉默要依赖于病毒在植物中的传播速度及与寄主植物生长之间的相互作用, 病毒的传播速度和有效沉默都会不同程度的受到环境因素的影响, 其中湿度和温度都是重要的影响因素[13]。本研究发现, TRV-VIGS 体系可以有效地沉默亚麻 *PDS* 指示基因, 说明在亚麻材料中建立的 TRV-VIGS 体系具有稳定性, 能够被用于研究亚麻的基因功能。然而影响病毒沉默效率还有很多的因素, 例如光照时间长短、寄主植株苗龄及生长状况和菌液浓度等等, 这些因素对不同亚麻品种影响仍需要进一步验证。

## 5. 结论

本研究成功建立了亚麻幼苗期 VIGS 基因沉默体系。在昼夜温度 24°C/18°C, 湿度 50%, 16 h/8 h 光周期环境下, 用 OD<sub>600</sub> 值约 1.0 的菌液数量浓度, 用 1 ml 注射器针头在亚麻叶片背面扎孔的方法侵染播种 15 d 左右的亚麻幼苗可获得最佳的沉默效率, 能够快速、有效地获得基因沉默效果。

## 基金项目

感谢南通市科技项目(JC2020156); 中国农业科学院麻类研究所横向课题(IBFC-KYSY-080); 国家自然科学基金项目(31801409)的资助。

## 参考文献

- [1] Suzan, H., Frank, L., Jack, V., *et al.* (2006) CDNA-AFLP Combined with Functional Analysis Reveals Novel Genes Involved in the Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 567-576.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0567>

- 
- [2] 许向阳, 赵振桐, 赵婷婷, 等. SLB9 基因沉默对番茄抗旱性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(12): 43-50.
- [3] 张向月. *GhSDHI-1* 正向调控棉花对黄萎病抗性的机制研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [4] 范强. *GhCOI1* 和 *GhMYC2* 基因对棉花黄萎病抗性的 VIGS 分析[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [5] 李建平, 郝晓燕, 李琴, 等. 棉花 VIGS 病毒载体的构建及其在抗病基因功能鉴定的应用[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(7): 1203-1208.
- [6] Joon-Woo, A., Rajeev, V., Moonil, K., *et al.* (2006) Depletion of UDP-d-apiiose/UDP-d-xylose Synthases Results in Rhamnogalacturonan-II Deficiency, Cell Wall Thickening, and Cell Death in Higher Plants. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512403200>
- [7] Livak, K. and Schmittgen, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [8] Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., *et al.* (2002) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 Like Genes Are Required for N-Mediated Resistance to Tobacco Mosaic Virus. *The Plant Journal*, **30**, 415-429. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01297.x>
- [9] Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. and Baulcombe, D. (2001) Technical Advance: Tobacco Rattle Virus as a Vector for Analysis of Gene Function by Silencing. *The Plant Journal*, **25**, 237-245. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>
- [10] Ekengren, S., Liu, Y., Schiff, M., *et al.* (2003) Two MAPK Cascades, NPR1, and TGA Transcription Factors Play a Role in Pto-Mediated Disease Resistance in Tomato. *The Plant Journal*, **36**, 905-917. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01944.x>
- [11] Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S. (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB Transcription Factors, COI1 and CTR1 in N-Mediated Resistance to Tobacco Mosaic Virus. *The Plant Journal*, **38**, 800-809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02085.x>
- [12] Lu, Ri., Martin-Hernandez, A., Peart, J., *et al.* (2003) Virus-Induced Gene Silencing in Plants. *Methods in Molecular Biology*, **236**, 287-294.
- [13] Burch-Smiths, T., Anderson, J., Martin, G., *et al.* (2004) Applications and Advantages of Virus-Induced Gene Silencing for Gene Function Studies in Plants. *The Plant Journal*, **39**, 734-746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>