

刘斯超, 许涛, 董秀芬, 等. 番茄 *SlIAA16* 沉默转基因植株的获得及功能初探[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 29–33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.007

番茄 *SlIAA16* 沉默转基因植株的获得及功能初探

刘斯超^{1,2}, 许涛¹, 董秀芬¹, 付欣¹, 郑鹏靖², 李兵²

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 河北省承德市蔬菜技术推广站, 河北承德 067000)

摘要: Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) 作为生长素早期响应因子, 其蛋白产物能够特异性地结合生长素响应因子 (auxin response factor, ARF), 从而调控生长素响应基因的表达, 在整个植物生长素信号转导过程中发挥着重要的作用, 进而影响植物的生长发育。本研究通过构建沉默载体, 在高效遗传转化体系下获得转基因植株, 发现利用 Gateway 克隆技术将番茄生长素早期响应基因 *SlIAA16* Domain II 区部分序列连入具有正反 2 个 attR 区域并连接 1 个内含子的 pB7GWIWG2 (I) 载体, 可在植株体内形成发卡结构导致植物基因沉默, 成功构建基因沉默表达载体名为 *SlIAA* RNAi; 此外, 抗生素喷施和 PCR 扩增以及实时定量检测进一步鉴定, 共获得 12 棵 *SlIAA16* RNAi 阳性植株。本研究结果将为进一步明确 *SlIAA* 的生物学功能和阐明生长素的作用机理提供参考。

关键词: 番茄; 生长素; *SlIAA16*; 载体构建; 基因表达

中图分类号: Q785; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0029-04

生长素 (IAA) 在植物的生长和发育中起着重要的作用, 它不仅作用于细胞膜引起细胞的快速反应, 而且还能够在分子水平上特异性地调控基因表达^[1-2]。Aux/IAA 作为生长素信号反应中的关键调控因子, 已经在拟南芥、番茄等模式植物中进行了广泛的研究^[3]。Aux/IAA 基因属于多基因家族, 目前在拟南芥中已发现有 29 个 Aux/IAA 家族基因, 水稻和玉米中均有 31 个成员, 黄瓜中有 28 个, 棉花上有 10 个, 马铃薯中有 27 个, 苹果中有 40 个, 草莓、高粱和番茄中有 26 个 Aux/IAA 家族成员^[4-10]。

通过对拟南芥功能获得性突变体的研究, 发现多数都是由 Aux/IAA 蛋白 Domain II 核心区 (VGWPP) 的某个氨基酸的改变引起的, 如 Aux/IAA 基因的突变会引起生长素反应因子 (ARF) 功能的紊乱, 使植株出现生长素相关的异常表型, 对生长素敏感性出现升高或降低^[11-14]。再如 *iaa7/axr2-1*、*iaa3/shy2-2* 突变体顶端优势减少, 表明突变体降低了对生长素的响应能力^[15]; 而 *iaa17/axr-1* 的突变体顶端优势增加, 表明突变体对生长素的响应能力增强了^[16]; *AtIAA28* 的突变体 *iaa28-1*、*SLR/IAA14* 的突变体 *slr-1* (*solitaryroot 1*)、*SHY/IAA3* 的突变体 *shy2* (*short hypocotyl 2*)、*AXR3/IAA17* 的半显性突变体 *axr3-1*, 它们都表现出类似的特征, 都影响侧根的发育^[17]; *AXR5/IAA1* 的突变体 *axr5-1* 表现出侧根减少、根和下胚轴向地性以及茎的向光性减弱、植株顶端优势丧失、种子数量减少、莲座叶变小等, 多种生长素早期响应基因的表达水平降低。在番茄 Aux/IAA 家族基因的研究中, 番茄 *SlIAA9* 与叶片形态、果实发育、植株顶端优势、营养及生殖生长等密切相关, 其表达下调可引起单性结实^[18]。番茄 *SlIAA3* 基因表达受抑制后, 会引起生长素和乙烯相关的发育缺陷, 如减少顶

端优势, 降低对生长素的响应能力, 促使黄化苗顶端弧度的增加等, 这表明 *SlIAA3* 参与了生长素与乙烯间的 cross talk^[19]。张俊红研究发现, *SlIAA4*、*SlIAA14* 基因影响番茄主根的生成, *SlIAA4* 基因的调控具有多效性, 在转基因番茄中不仅发现了叶片融合的现象, 还发现了花与果实等多器官融合的表现型^[20]。Bassa 等研究发现番茄 *SlIAA27* 可以引起单性结实, 且果实形状为尖果型^[21]。Xu 等研究发现 *SlIAA15* 上调表达影响叶片的气孔发育及叶片的形状^[22]。

目前有关番茄 *SlIAA16* 基因在生长发育中的作用尚无详尽报道。本研究通过转基因手段获得 *SlIAA16* RNAi 植株, 在对呈现的表型进行分析的基础上, 探讨 *SlIAA16* 调控植物生长发育的作用机制, 这有利于深化对 Aux/IAA 功能的认识, 进一步了解生长素及其信号转导的分子机制, 指导我们在生产实践中利用生长素及转基因技术调节植株生长与发育、果实成熟及产量提升等^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在沈阳农业大学蔬菜实验基地进行, 供试番茄品种为中蔬 6 号, 由中国农业科学院提供。供试植物总 DNA 及 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒等购自北京天根生化科技有限公司; Prime STAR、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA marker 及反转录药品等购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 其他常规药品为国产分析纯。pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit 和 Gateway LR Clonase Enzyme Mix 为 Invitrogen 公司产品。以除草剂 *bar* 基因为筛选标记的植物表达载体 Pb7GWIWG2 (I) (<http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pB7GWIWG2%281%29/search/index/silencing/any>)、大肠杆菌菌株 DH5α、根癌农杆菌 LBA4404 为笔者所在实验室留存。

1.2 方法

1.2.1 *SlIAA* 沉默载体的构建 根据已经获得的 cDNA 全

收稿日期: 2016-04-04

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30900982)。

作者简介: 刘斯超 (1988—), 男, 山东聊城人, 硕士, 从事蔬菜栽培与生理研究。E-mail: m13644976629@163.com。

长,按照 RNAi 原理,设计引物 F:5′-CACCGGAATGAACT-GGAATCG-3′,R:5′-CCGCTTTAGAGGCCGTGG-3′。PCR 扩增干扰片段并胶回收纯化;TOPO Cloning 及热激法转化大肠杆菌;碱裂解法少量提取质粒 DNA。

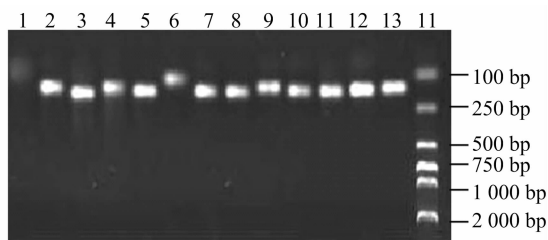
1.2.2 番茄植株 *SlIAA16* RNAi 的遗传转化 将构建好的质粒用电击法导入农杆菌 LBA4404,用农杆菌介导遗传转化方法转化番茄,待转化植株根系达到 5 cm 时,将其移栽钵钵。

1.2.3 阳性植株的筛选 通过 Blast 搜索 *bar* 基因序列,设计引物。序列为 F:5′-GATAATCATCGCAAGACC-3′;R:5′-TCGACCGTGTACGTCTC-3′。以未转化的中蔬 6 号植株的基因组 DNA 作为阴性对照,遗传转化 *SlIAA16* RNAi 载体质粒作为阳性对照,扩增目的片段。PCR 扩增程序参照 *bar* 基因引物及酶的扩增条件等来设定。

2 结果与分析

2.1 *SlIAA16* RNAi 表达载体 PCR 及酶切检测

将测序成功的克隆重新提取质粒,采用质粒 PCR 的方法检测终载体,挑去若干个单克隆,同时以空载体质粒作为对照,用特异性引物进行 PCR。结果表明 pB7G-IAA16 表达载体已成功构建,初步验证 *SlIAA16* 整合进入目的载体(图 1)。



M—DNA marker 2 000; 1—空载体 PCR;
2~13—载体 PCR 扩增后片段

图1 LR 反应后载体克隆 PCR 检测

对 RNAi 载体进行限制性内切酶酶切验证 *SlIAA* 片段整合的正确性,特别是 RNAi 载体中的发夹结构。选用了 *EcoR* I、*Hind* III、*Xba* I 这 3 种酶对构建的 RNAi 载体进行酶切验证,结果发现,用这 3 种酶切 LR 反应前的载体 pB7GWIWG2 分别能切出 3 237、3 180、2 167 bp 的片段;LR 反应之后的载体用 *Hind* III 酶切可以切出 196 bp 的片段以及另外 2 个大小的片段,这 3 个片段总长为 2 148 bp,因为本连入片段分别第 293、488 bp 有该酶的酶切位点,*Xba* I 可以切出 584 bp 长度的片段,而 *EcoR* I 酶切位点位于 *ccdB* 基因上,因此 LR 反应后不能切出片段(图 2)。

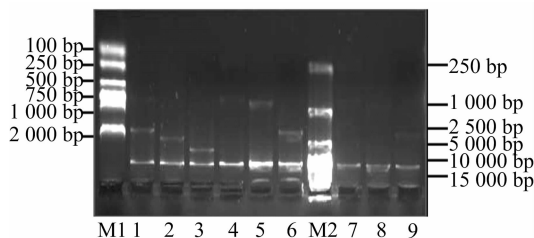
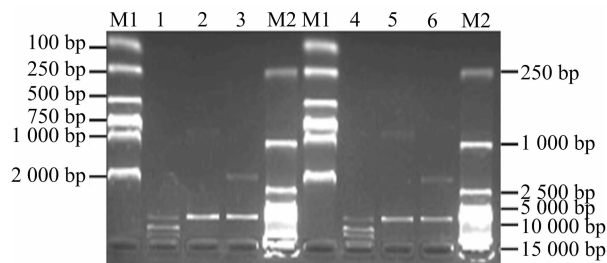


图2 RNAi 载体酶切检测

2.2 电击转化农杆菌检测

将大肠杆菌中提取的 *SlIAA16* RNAi 表达载体质粒电击转化农杆菌 LBA4404,利用含有壮观霉素及利福平的 YEP 固

体培养基平板筛选,并挑选单菌落 PCR(酶切方法)检测挑选阳性克隆,1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 3)。



M—DNA marker 2 000; M2—DNA marker 15 000;
1~3—*Xba* I 酶切产物; 4~6—*Hind* III 酶切产物

图3 *SlIAA16* RNAi 表达载体农杆菌酶切检测

2.3 *SlIAA16* RNAi 植株的遗传转化

本试验所用的植物双元载体 pB7GWIWG2(I) 含有 *bar* 基因(图 4),所以在整个过程中始终保持 0.5 mg/L 草铵膦的抗性筛选,并建立了转基因植株的再生体系,成功地获得了再生植株(图 5)。

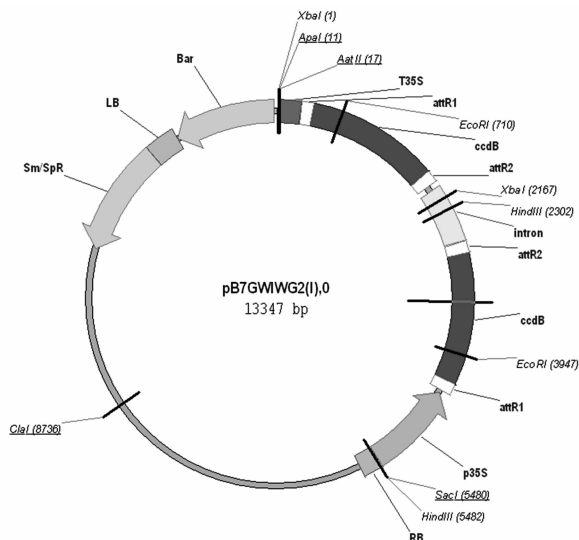


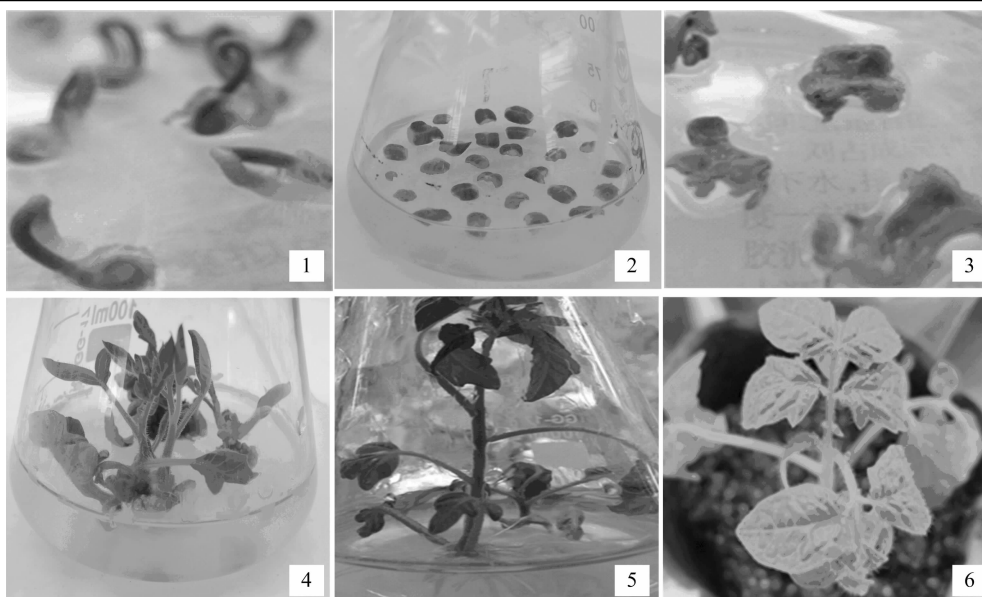
图4 pB7GWIWG2(I)载体

2.4 阳性植株的筛选

2.4.1 草铵膦(PPT)喷施筛选转基因植株 对无草铵膦抗性的番茄幼苗,进行草铵膦抗性喷施。喷施 10 d 后发现,当草铵膦浓度为 1.5 mg/L 时,幼苗生长良好,下部叶片仅出现少量褐斑点;浓度为 3 mg/L 时,下部叶片出现黄化,仍能正常生长;浓度为 6 mg/L 时,植株叶片黄化,生长势降低(图 6-a)。说明筛选转基因苗最佳浓度为 6 mg/L。

对转基因幼苗进行 6 mg/L 的草铵膦喷施,4 d 后观察发现,不具有草铵膦抗性的转基因植株真叶的叶边缘开始黄化,叶片腐软,随着时间延长,黄化现象开始向整株叶片扩散,生长点灼伤,甚至出现植株死亡;而有草铵膦抗性的植株则无明显变化(图 6-b、图 6-c)。通过喷施筛选得到 33 棵抗性植株。

2.4.2 PCR 筛选转基因植株 选取已经通过 PPT 筛选的转基因植株 12 株,PCR 法检测发现条带一致且纯度较高的可以认为 DNA 无降解,可用于下一步 PCR 检测。在转基因沉默植株中可以检测到 750 bp 的 PCR 产物条带,转化植株的条带与质粒扩增的条带大小一致,大约都为 750 bp(图 7)。



1—种子萌发; 2—共培养; 3—选择培养; 4—继代培养; 5—生根培养; 6—炼苗移栽

图5 转基因植株的再生流程

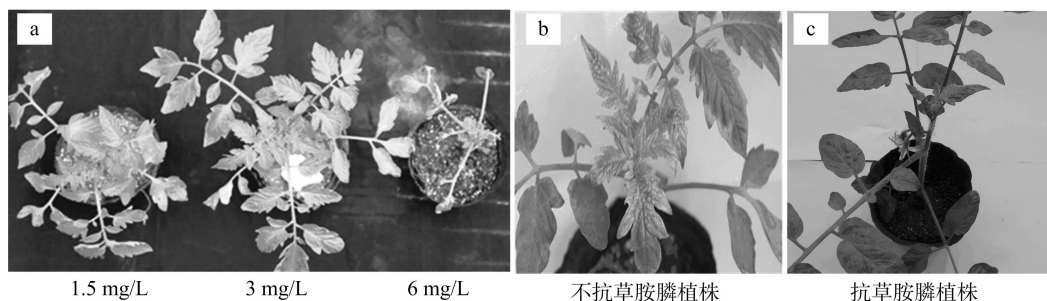


图6 喷施草胺磷后植株表现

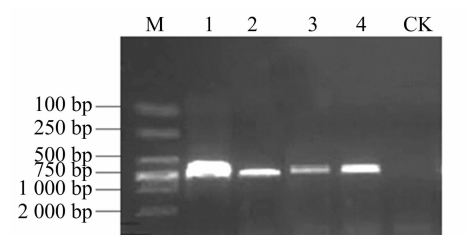
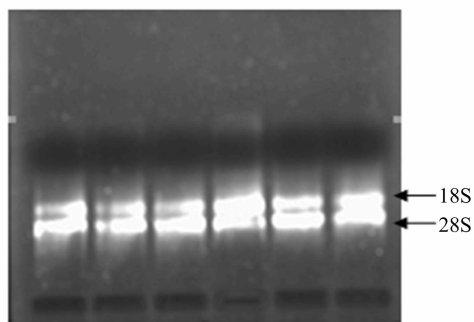
M—DNA marker 2 000; 1—pB7GWIWG2(I)质粒; 2~4—*SIIAA16* 沉默植株; CK—中蔬 6 号

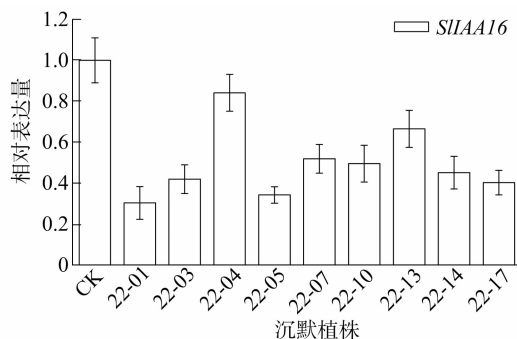
图7 部分转基因植株的 PCR 检测

2.5 实时定量 PCR 检测转基因植株目的基因的表达

利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,发现 18S、28S 条带清晰,可用于 cDNA 的合成(图 8 - a)。对目的基因 *SIIAA16* 的表达量进行实时定量分析,发现 *SIIAA16* 沉默植株 22 - 01、22 - 05、22 - 17、22 - 03、22 - 14、22 - 10、22 - 07 的表达量均显著低于正常植株,分别降低 75%、70%、60%、60%、55%、50%、50%(图 8 - b)。这进一步验证了前面筛选获得的转基因植株是阳性植株,依据数据结果,主要选择 22 - 01 转基因株系作为主要研究对象。



(a)



(b)

图8 番茄总 RNA 提取结果(a)以及实时定量分析 T 代 *SIIAA16* 沉默植株的表达(b)

2.6 *SlIAA16* 组织特异性表达分析

在 qRT-PCR 分析中,全部以功能叶为对照。*SlIAA16* 在番茄的茎和花中表达较高,分别是对照的 3 倍和 2.5 倍,在果实中的表达相对较少(图 9-a)。*SlIAA16* 在叶片不同部位的表达。结果显示,*SlIAA16* 在叶基和幼苗中的表达水平显著高于对照,分别是对照的 7 倍和 11 倍(图 9-b)。*SlIAA16* 在幼

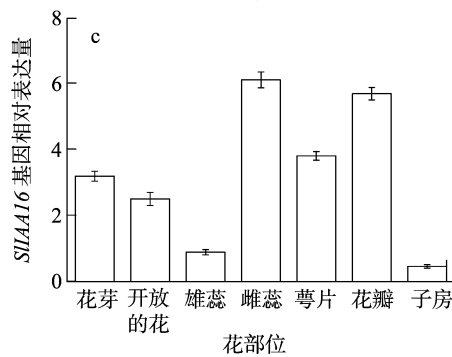
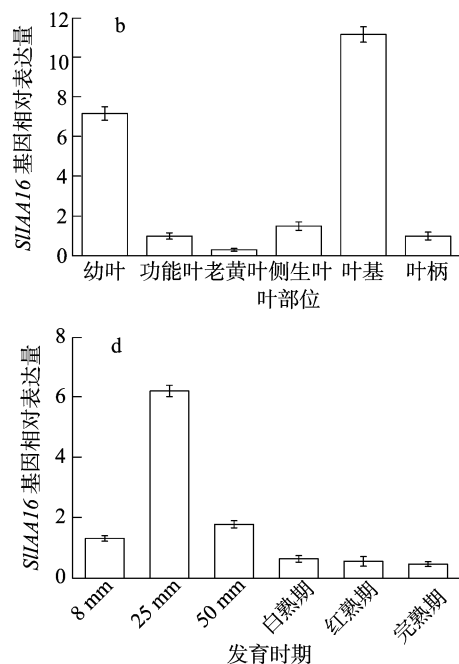
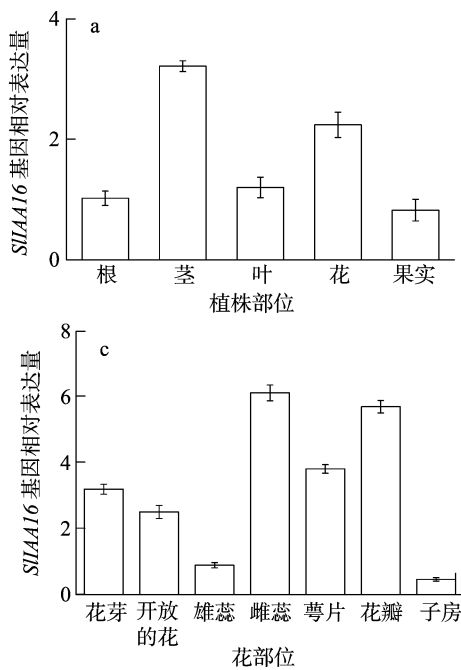


图9 *SlIAA16* 基因组织特异性表达的实时定量分析

3 讨论与结论

将番茄 *SlIAA16* 基因 Domain II 区部分序列连入 pB7GWIWG(II) 载体,载体特点为具有 2 个连续倒置的序列片段并且中间含有内含子,以形成发卡结构导致基因沉默,成功构建沉 RNAi 表达载体名为 *SlIAA* RNAi 表达载体。在构建载体过程中本研究采用的方法是在传统的基础上略加改进的载体构建方式,即利用最新的入门克隆载体,该载体上已经连入 attL 序列,这样就跳过了 BP 反应,直接将纯化回收后的 PCR 产物通过 TOPO 克隆反应连入入门克隆载体就可以进行 LR 反应了,与传统 BP 加 LR 反应相比更加方便快捷。在选择入门克隆的时候要注意入门克隆载体与目的载体的抗性,二者的抗性要求是不同的,这样在后续筛选阳性克隆时也更加方便,本试验构建的 RNAi 载体的入门克隆在片段连入时对连入的方向也进行了选择,所以在设计引物时在前引物的 5'端增加了 CACC 这 4 个碱基。利用 Gateway 技术构建的载体是 1 种二元载体,因此能直接用于农杆菌介导的植物转化,从而为利用 RNA 干扰技术大规模、高通量的研究植物特异和未知基因功能打开方便之门。

转基因植株的检测作为植物基因工程中的重要一环,越来越成为人们研究的重点。在本试验中,对 *SlIAA16* 沉默植株的检测,主要通过外源喷施、PCR 检测、RT-PCR 检测等方法相互结合,来进一步减少转基因植株的假阳性。虽然,组培筛选及叶片喷施筛选也存在一定的局限性,如叶片喷施草甘膦容易造成植株的大量减产,组培筛选也会因为在时间的把

握上存在差别而对草甘膦的反应可能不敏感^[15,18]。因此,这就需要在试验中尽量把握好种子萌发过程中草甘膦的浓度及处理时间,重点观察幼嫩叶片对外源喷施筛选的反应情况。

参考文献:

- [1]董秀春. 毛白杨生长素信号转导因子基因的分离与功能的初步分析[D]. 泰安:山东农业大学,2008:6-37.
- [2]方佳,勇清,余敏芬,等. 植物生长素响应因子基因的研究进展[J]. 浙江农林大学学报,2012,29(4):611-616.
- [3]Woodward A W, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction [J]. Annals of Botany, 2005, 95(5): 707-735.
- [4]张士云. 生长素早期响应基因 *Aux/IAA* 的研究进展[J]. 分子植物育种, 2013, 11(29): 1211-1218.
- [5]Liscum E, Reed J W. Genetics of *Aux/IAA* and ARF action in plant growth and development [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(3/4): 387-400.
- [6]王垒, 娄丽娜, 闫立英, 等. 黄瓜果实发育早期 *Aux/IAA* 家族部分基因的差异表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4): 13-17.
- [7]Wang Y J, 2012 De X, Bian Y L, et al. Genome-wide analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(8): 3991-4001.
- [8]Devogelaere F, Doucen T, Guitton B, et al. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus × domestica*) fruit size control [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 7.
- [9]韩晓勇. 陆地棉 *Aux/IAA* 家族九个基因的克隆和表达分析[D]. 南京:南京农业大学, 2010: 21-55.

王华宇,陈乃明,杨利平,等.扁桃斑鸠菊无性快繁及栽培产业化技术[J].江苏农业科学,2017,45(5):33-36.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.008

扁桃斑鸠菊无性快繁及栽培产业化技术

王华宇,陈乃明,杨利平,梁刚,蔡林

(钦州市林业科学研究所,广西钦州 535099)

摘要:建立了扁桃斑鸠菊的组培快繁技术体系,并进行了扦插育苗和造林技术研究,初步完成了种苗的规模化生产和示范林建设。研究表明,外植体表面消毒以 75% 乙醇预处理 10 s,再用 0.1% 氯化汞浸泡 8 min 效果最好;继代培养的最适宜培养基为 MS + 6-BA 0.2 mg/L + IBA 0.05 mg/L,增殖系数可达到 4.0;最适宜的生根培养基为 1/2MS + IBA 0.1 mg/L,生根率可达 100%;将生根后的植株进行移栽,在轻基质(泥炭:珍珠岩=2:1)和黄心土中成活率均可达 90% 以上;其插穗在轻基质中扦插成活率为 86.7%。造林 1 年后,成活率达到 96% 以上,平均株高可达 2.9 m,适应性强,易于实现产业化。

关键词:扁桃斑鸠菊;无性快繁;栽培

中图分类号:S317 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0033-04

扁桃斑鸠菊(*Vernonia amygdalina* Del.),别称桃叶斑鸠菊、神奇叶、苦树、南非树等,为菊科斑鸠菊属植物,原产于非洲。扁桃斑鸠菊可以长成大树,栽培状态下多被修剪为灌木或篱笆,高 2~5 m,喜光,宜在潮湿环境中生长,也耐干旱,适

应所有土壤类型。扁桃斑鸠菊叶子可以安全食用,在尼日利亚等地被当作一种蔬菜。其叶片具有独特的气味和苦涩感,因而常被称为苦叶^[1-3],可作为杀菌剂或啤酒花的替代品^[4]。在西部非洲,扁桃斑鸠菊的叶子提取物被用作药物,用于治疗疟疾、蠕虫感染、厌食和妇科疾病治疗,有研究认为,其叶可以安全食用^[5]。此外,Howard 等通过扁桃斑鸠菊的提取物作用于乳腺癌细胞试验,认为 *Vernonia amygdalina* 是较好的纯天然抗肿瘤制剂^[6]。目前,已从扁桃斑鸠菊中分离出 5 类共 32 种化合物,其主要活性成分有皂苷、生物碱、萜类、类固醇、香豆素类等,具有多种药用价值,其中包括确切的抗肿瘤作用值

收稿日期:2016-01-31

基金项目:广西钦州市科技开发项目(编号:201322030);广西创新计划专项(编号:2013CXJHB08)。

作者简介:王华宇(1981—),男,河南南阳人,硕士,高级工程师,主要从事植物生物技术和栽培技术研究。E-mail:hywangsky@163.com。

[10] Audran - Delalande C, Bassa C, Mila I A, et al. Genome - Wide identification, functional analysis and expression profiling of the *Aux/IAA* gene family in tomato[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012, 53(4): 659 - 672.

[11] Wu J, Peng Z, Liu SY, et al. Genome - wide analysis of *Aux/IAA* gene family in Solanaceae species using tomato as a model[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(4): 295 - 311.

[12] Fukaki H, Tameda S, Masuda H, et al. Lateral root formation is blocked by a gain - of - function mutation in the *SOLITARY - ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2002, 29(2): 153 - 168.

[13] Overvoorde P J, Okushima Y, Alonso J M, et al. Functional genomic analysis of the *AUXIN/INDOLE - 3 - ACETIC ACID* gene family members in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3282 - 3300.

[14] Song Y, Wang L, Xiong L. Comprehensive expression profiling analysis of *OsIAA* gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments[J]. *Planta*, 2009, 229(3): 577 - 591.

[15] Wilson A K, Pickett F B, Turner J C, et al. A dominant mutant in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid [J]. *Molecular and General Genetics*, 1990, 222(2): 377 - 383.

[16] Blilou I, Frugier F, Folmer S, et al. The *Arabidopsis* hobbit gene encodes a CDC 27 homolog that links the plant cell cycle to progression

of cell differentiation[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(10): 2566 - 2575.

[17] Fukaki H, Tameda S, Masuda H, et al. Lateral root formation is blocked by a gain - of - function mutation in the *SOLITARY - ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2002, 29(2): 153 - 168.

[18] Wang H, Jones B, Li Z G, et al. The tomato *Aux/IAA* transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(10): 2676 - 2692.

[19] Chaabouni S, Jones B, Delalande C, et al. Sl - IAA3, a tomato *Aux/IAA* at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(4): 1349 - 1362.

[20] 张俊红. 番茄 *Aux/IAA* 基因的克隆与功能分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2005: 51 - 60.

[21] Bassa C, Mila I, Bouzayen M A. Phenotypes associated with down - regulation of Sl - IAA27 support functional diversity among *Aux/IAA* family members in tomato[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(9): 1583 - 1595.

[22] Xu T, Wang Y L, Liu X, et al. Solanum lycopersicum IAA15 functions in the 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid herbicide mechanism of action by mediating abscisic acid signalling [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(13): 3977 - 3990.