

李然然,王述彬,潘宝贵,等. 辣椒病毒诱导基因沉默接种方法的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):82-84.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.023

辣椒病毒诱导基因沉默接种方法的优化

李然然^{1,2}, 王述彬², 潘宝贵², 刁卫平², 郭广君², 刘金兵², 戈伟²

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, 简称 VIGS)技术在候选基因功能验证方面起着非常重要的作用。以辣椒八氢番茄红素脱氢酶基因(简称 *PDS*)为目标基因,分析表达载体转化农杆菌的菌液在 LB 液体培养基和诱导培养基(IM)中 $D_{600\text{ nm}}$ 值的变化趋势。结果表明,当 LB 液体培养基中菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.15 时,后续利用 IM 培养菌液的效率最高,*PDS* 基因沉默效果明显;优化了农杆菌接种方法,可为辣椒利用 VIGS 技术进行候选基因的功能验证提供参考。

关键词:辣椒;VIGS;农杆菌接种;基因沉默

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0082-03

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, 简称 VIGS)是通过携带靶基因的病毒侵染植株而引起寄主植株对应的目标基因沉默,使该基因不能继续表达,进而探究基因功能的一种方式^[1-2]。目前,VIGS 技术已被广泛应用,棉花^[3]、烟草^[4]、拟南芥^[5]、大麦^[6]、大豆^[7]等植物都已经成功构建了 VIGS 体系,茄科作物^[8-10]也开始普遍利用 VIGS 技术研究基因功能。候选基因 VIGS 载体构建成功后,农杆菌接种侵染植株是 VIGS 的关键步骤,农杆菌菌液培养占据了大量的时间,其中菌液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值是试验的关键点。沉默八氢番茄红素脱氢酶基因(简称 *PDS*)可使植株出现明显的白化症状,*PDS* 基因常用作 VIGS 试验的阳性对照基因^[11]。本试验以 *PDS* 为目标基因构建 VIGS 载体接种辣椒,分析在农杆菌振荡培养过程中菌液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,从而简化摇菌的测量次数,为利用 VIGS 方法进行候选基因功能验证提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试辣椒材料为江苏省农业科学院蔬菜研究所高效园艺作物遗传改良重点实验室保存的 G43(*Capsicum annuum* L.)。VIGS 载体 pTRV1、pTRV2:00、pTRV2:*PDS* 转化农杆菌 GV3101 菌液引自西北农林科技大学。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料培养 2015 年 10 月,利用 RGL-P1000D 人工气候箱育苗,出苗前 30℃、黑暗培养,出苗后,昼、夜温度 28/20℃,光照 375 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (光照—黑暗为 12 h—12 h),湿度 60%,培养至 2 张子叶完全展开、真叶尚未长出时用于接种。

收稿日期:2016-03-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31401866);江苏省自然科学基金(编号:BK20141380)。

作者简介:李然然(1992—),女,山东德州人,硕士研究生,主要从事辣椒抗病研究。E-mail:liiranran92@163.com。

通信作者:王述彬,博士,研究员,主要从事辣椒遗传育种研究。E-mail:wangsbpep@163.net。

1.2.2 试剂配制 试剂的配制参照 Velásquez 等^[12]所述,配制体积稍有改动。

20×AB 盐配制: NH_4Cl 20.00 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.00 g、 KCl 3.00 g、 CaCl_2 0.20 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,用超纯水定容至 1 L,121℃灭菌 20 min(若出现沉淀,需要涡旋),备用。

诱导培养基(IM)配制:2-(N-吗啉)乙磺酸—水合物(MES)5.137 g、葡萄糖 2.632 g、 NaH_2PO_4 0.164 g,用超纯水定容至 500 mL,调节 pH 值为 5.6,121℃灭菌 20 min,待溶液冷却后加 AB 盐 26.316 mL。IM 当天或提前 1 d 配制,500 mL IM 使用前加入 500 μL 200 mmol/L 乙酰丁香酮、26.316 mL 20×AB 盐、500 μL 50 mg/mL 卡那霉素、利福平、庆大霉素。

200 mmol/L 乙酰丁香酮配制:19.6 mg 乙酰丁香酮溶于 500 μL 二甲亚砜(DMSO)。

乙磺酸(MES)溶液配制: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.016 5 g, MES 1.066 0 g,用超纯水定容至 500 mL,调节 pH 值至 5.5,121℃灭菌 20 min。

1.3 接种方法

参照 Velásquez 等^[12-13]的方法。

1.3.1 划线 在 -80℃冰箱中取出 pTRV1、pTRV2:00、pTRV2:*PDS* 转化农杆菌 GV3101 菌液,冰上融解,分别在 3 抗 LB 琼脂板(含 50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平、50 mg/L 庆大霉素)上划线,用封口膜封好,标注好名称及日期,置于 28℃培养 36 h 左右。

1.3.2 挑取单菌落培养 准备 3 个 100 mL 锥形瓶,分别加入 10 mL 液体 LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平、50 mg/L 庆大霉素),再分别挑取 pTRV1、pTRV2:00、pTRV2:*PDS* 单菌落至锥形瓶中,用封口膜封好,28℃、200 r/min 培养。

1.3.3 IM 摇菌 按 1:25 的比例混合菌液和 IM。pTRV1 配制 2 瓶, pTRV2:00、pTRV2:*PDS* 各配 1 瓶,28℃、200 r/min 培养 27~37 h 至菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.5~0.8。

1.3.4 收集菌体 将菌液分别移入 50 mL 离心管中,4℃、3 000 g 离心 10 min,移除液体,加入等体积 MES 重悬,4℃、3 000 g 再次离心 10 min,收集菌体,用 1/2 体积的 MES 重

悬。向 pTRV1 内加入 200 mmol/L 乙酰丁香酮,使乙酰丁香酮终浓度为 400 mmol/L,按 1 : 1 将 pTRV1 分别与 pTRV2 : 00、pTRV2 : PDS 混合,使乙酰丁香酮终浓度为 200 mmol/L, $D_{600\text{ nm}}$ 值约为 0.6,置于 22 ~ 25 ℃ 静置 3 ~ 5 h,用于注射接种。

1.3.5 接种幼苗 接种前 1 d 浇水。接种时,在子叶中下部靠近叶脉处用 2 mL 一次性注射器打孔,用无针头的一次性注射器在子叶背面注射菌液,直至整张子叶充满水渍。注意在注射不同菌液时要更换手套与注射器,避免交叉污染。

1.3.6 接种后培养 接种后,将幼苗置于人工气候箱中,先 18 ℃、黑暗条件培养 2 d,再将培养条件调至昼、夜温度 22、18 ℃,光照 375 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (16 h—8 h),湿度 60% 条件下培养。接种后 3 d 控水以增加发病率。

1.4 数据分析

试验设 5 次重复,采用 Eppendorf BioPhotometer plus 测量菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值,利用 Excel 2007 工作簿进行数据整理分析。

2 结果与分析

2.1 不同 LB 菌液对 IM 菌液培养时间的影响

对 pTRV1、pTRV2 : 00、pTRV2 : PDS 用 LB 培养基摇菌后 $D_{600\text{ nm}}$ 为 1.00、1.05、1.10、1.15、1.20 的菌液进行 IM 摇菌,用时 20 ~ 23 h。结果发现, $D_{600\text{ nm}}$ 值在 1.15 时进行 IM 摇菌是效率最高的(表 1)。当 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.00 时,用 IM 摇菌达不到 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.5;随着 LB 培养基 $D_{600\text{ nm}}$ 值的增加,用 IM 摇菌的效率也逐渐增加,到 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.15 时效率达到最高;当 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.20 时,用 IM 摇菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.5 的时间开始增加。

表 1 不同 LB 菌液对 IM 菌液培养时间的影响

LB 菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值	IM 菌液 $D_{600\text{ nm}} = 0.5$ 培养时间 (h)
1.00	未达到
1.05	48.2 ± 3.5
1.10	41.5 ± 2.6
1.15	28.5 ± 1.3
1.20	34.7 ± 2.4

表 2 10 mL LB 培养基摇菌情况

菌液	$D_{600\text{ nm}}$ 值						
	17.00 h	18.00 h	19.00 h	19.50 h	19.60 h	19.70 h	19.73 h
A	0.337	0.600	0.790				1.163
B	0.383	0.642	0.840				1.198
C	0.415	0.677	0.906	1.019	1.075	1.138	1.152
D	0.420	0.702	0.910	1.022	1.088	1.140	1.154
E	0.434	0.713	0.937	1.050	1.110	1.162	

2.4 IM 菌液培养时间与其浓度的关系

LB 培养基摇菌 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 1.15 左右后,再按菌液 : IM = 1 : 25 的比例进行混合,做 5 次重复,分别为菌液 1、2、3、4、5,继续摇菌。由表 3 可以看出,在相同起始 $D_{600\text{ nm}}$ 值下,再进行 IM 摇菌,所需摇菌时间也有些差异。一般来说,当 LB 培养基 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 1.15,再进行 IM 摇菌,可在摇菌后 27 h 测量,再根据所测数据估计摇菌时间。由于 IM 摇菌所需时间远远多于 LB 培养基,而且所需 $D_{600\text{ nm}}$ 值范围并不是那么严格,在 0.5 ~ 0.8 均可,初次测量 $D_{600\text{ nm}}$ 值时间可以稍微

2.2 不同菌体 LB 摇菌随着时间 $D_{600\text{ nm}}$ 值的变化

分别对 pTRV1、pTRV2 : 00、pTRV2 : PDS 用 LB 培养基摇菌,并分别在 17、18、19、20 h 测量菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值,做 3 次重复,取平均值,所得结果如图 1 所示,三者柱状图相似,说明不同菌体之间摇菌时间与对应 $D_{600\text{ nm}}$ 值变化相似。因此,若想探究菌体摇菌时间与对应 $D_{600\text{ nm}}$ 值变化的关系,仅用 1 种菌体进行试验即可。

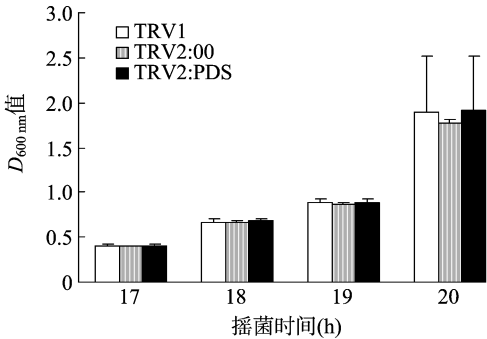


图 1 不同菌体 LB 摇菌随着时间 $D_{600\text{ nm}}$ 值的变化

2.3 LB 液体培养基培养菌液

用 pTRV1 探究菌体摇菌时间与对应 $D_{600\text{ nm}}$ 值变化的关系,挑取 5 个单菌落(A、B、C、D、E),分别用 10 mL 液体 LB 培养基在 100 mL 锥形瓶中 28 ℃、200 r/min 振荡培养,所用时间及对应 $D_{600\text{ nm}}$ 值见表 2。在摇菌 19.0 h 时菌液 C、D、E 的 $D_{600\text{ nm}}$ 值已达到 0.90 以上,增加测量密度,19.50 h 后其 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 1.00 以上,进一步增加测量密度,结果菌液 C、D 在 19.73 h、菌液 E 在 19.70 h 分别达到所需 $D_{600\text{ nm}}$ 值,而菌液 A、B 在摇菌 19.00 h 时 $D_{600\text{ nm}}$ 值在 0.80 左右,可不必增加测量密度。

根据测量结果,菌液在摇菌 19.70 ~ 20.00 h 后达到所需 $D_{600\text{ nm}}$ 值,若想减少测 $D_{600\text{ nm}}$ 的次数,可以在摇菌 19.00 h 时测 $D_{600\text{ nm}}$ 值,并根据所测值与表 2 中数据对比,估算再摇菌时间。如 $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.90,预计再摇 45 min 可达到所需值; $D_{600\text{ nm}}$ 值达到 1.00,预计再摇 15 min 即可达所需值。

晚一点。

由于菌液在不同 $D_{600\text{ nm}}$ 值下的增长速度不同,计算不同菌液在不同时间段的平均值可能与菌液的真正 $D_{600\text{ nm}}$ 值变化有所差异,因此,菌液原始的 $D_{600\text{ nm}}$ 值变化更能说明问题,也更方便做类似试验的研究人员查阅。

2.5 MES 重悬对菌液浓度的影响

离心可能会造成菌体不能全部回收,导致 $D_{600\text{ nm}}$ 值下降,一般用等体积 MES 重悬后的 $D_{600\text{ nm}}$ 值相较菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值下降到原来的 2/5。因此,可根据等体积 MES 重悬之后的 $D_{600\text{ nm}}$

表 3 IM 摇菌时间与所测 $D_{600\text{ nm}}$ 的关系

菌液	$D_{600\text{ nm}}$ 值									
	17 h	19 h	21 h	23 h	25 h	27 h	29 h	31 h	33 h	34 h
菌液 1	0.291	0.320	0.360	0.375	0.406	0.429	0.445	0.485	0.492	0.501
菌液 2	0.297	0.319	0.355	0.381	0.415	0.433	0.456	0.490	0.505	0.516
菌液 3	0.314	0.348	0.376	0.412	0.442	0.468	0.494	0.520		
菌液 4	0.312	0.340	0.387	0.399	0.428	0.460	0.486	0.533		
菌液 5	0.289	0.324	0.367	0.399	0.444	0.484	0.526			

值适当加第 2 次 MES 重悬的量,或根据 IM 摇菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值适当减少第 1 次 MES 重悬的量,使最终 $D_{600\text{ nm}}$ 值约为 0.3 左右。

2.6 pTRV2 : PDS 基因沉默效果

从图 2 可见,接种 pTRV2 : PDS 3 周后,辣椒幼苗叶片出现白化症状,其中第 1、2 张叶片的基部及主脉处明显白化,第 3 张新生叶片全部白化;接种 4 周后,幼苗第 1、2 张叶片的白化范围扩大,第 3、4 张新生叶片全部白化。接种空载体 (pTRV2 : 00) 幼苗比接种 pTRV2 : PDS 幼苗的长势稍好,而未接种植株 (WT) 明显比接种植株长势旺盛。本试验方法能达到 PDS 基因沉默的目标,可用于后续的基因功能验证。

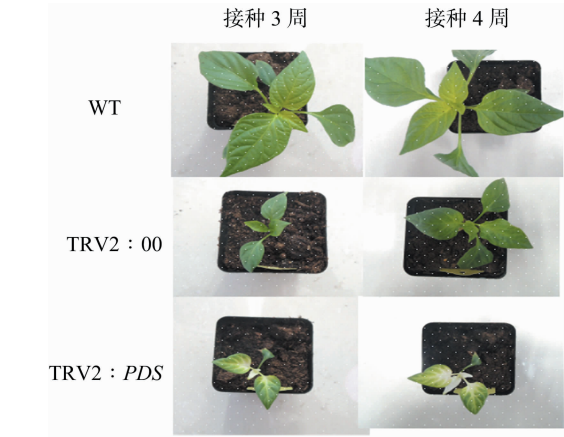


图2 辣椒叶片接种 pTRV2 : PDS 的表型

3 结论与讨论

随着 VIGS 技术的逐渐成熟,不同研究人员采用的农杆菌接种方法有所差异,有的用 LB 培养基摇过之后就直接用 MES 重悬^[9],此方法虽然也可以使基因沉默,但是用 IM 再次摇菌可以提高菌体活性,提高沉默效率。

在进行农杆菌接种试验时,LB 培养基摇菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值将影响后期 IM 摇菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,本研究得出了最佳的 LB 培养基摇菌 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.15,而且通过所列举 IM 摇菌数据可以推算所需摇菌时间,从而合理安排开始摇菌时间,因为 IM 摇菌时间过长会对菌体活性产生影响,尽量避开摇菌结束时间在晚上,以增加菌体活性,保证最高沉默效率。

Zhang 等的试验中仅说明了在 LB 液体培养液振荡培养时需要 24 ~ 36 h,IM 振荡培养时需 20 ~ 24 h,本试验探究 LB 培养基和 IM 摇菌时间与 $D_{600\text{ nm}}$ 值的关系,得出 LB 培养基摇菌要在摇菌 17 h 时测量 $D_{600\text{ nm}}$ 值,IM 摇菌要在摇菌后 27 h 进行测量的结论^[13]。所得时间节点与 Zhang 等稍微有所差别,但根据本试验结果,在 Zhang 等的试验条件下 LB 液体培养基浓度

可能比较高,难以掌控菌体最佳活性时期。本试验在 Zhang 等的基础上更加精确了摇菌时间,方便研究人员参考查阅。

采用本研究方法接种,辣椒叶片白化症状明显,说明本试验方案可行,为应用 VIGS 技术研究辣椒相关基因功能奠定了基础。

参考文献:

[1] 张增艳,姚乌兰,辛志勇. 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[J]. 植物遗传资源学报,2006,7 (1):100 - 105.

[2] Burch - Smith T M, Anderson J C, Martin G B, et al. Applications and advantages of virus - induced gene silencing for gene function studies in plants [J]. Plant Journal,2004,39(5) :734 - 746.

[3] Tuttle J R, Idris A, Brown J K, et al. Geminivirus - mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton [J]. Plant Physiology,2008,148(1) :41 - 50.

[4] Ratcliff F, Martin - Hernandez A M, Baulcombe D C . Technical advance:tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. The Plant Journal,2001,25(2) :237 - 245.

[5] Turnage M A, Muangsan N, Peele C G, et al. Geminivirus - based vectors for gene silencing in Arabidopsis [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology,2002,30(1) :107 - 114.

[6] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. Barley stripe mosaic virus - induced gene silencing in a monocot plant [J]. Plant Journal,2002, 30(3) :315 - 327.

[7] Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, et al. Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus - induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes [J]. Virology, 2009, 386 (2) : 407 - 416.

[8] 张庆琛,魏 理,丁锦平,等. 辣椒病毒诱导基因沉默体系的构建 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2012,40(5) :133 - 136.

[9] 马红珍,裴冬丽,耿慧霞,等. 病毒诱导番茄的基因沉默[J]. 西北植物学报,2009,29(8) :1531 - 1537.

[10] Liu Y, Schiff M, Dinesh - Kumar S P . Virus - induced gene silencing in tomato [J]. Plant Journal,2002,31(6) :777 - 786.

[11] 张花美,朱胜男,张丽莎,等. 病毒诱导的基因沉默[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版),2001,10(3) :158 - 162.

[12] Velásquez A C, Chakravarthy S, Martin A G B . Virus - induced gene silencing (VIGS) in Nicotiana benthamiana and tomato [J]. Journal of Visualized Experiments,2009,28(28) :1292.

[13] Zhang Z, Li D W, Jin J H, et al. VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by CaMYB in chili pepper leaves [J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:500.