

Y 773568

分类号:
密 级:

单位代码: 10019
学 号: B02332

中国农业大学

博士学位论文

番茄中病毒诱导基因沉默体系的建立及
LeEIN2 基因功能分析

Establishment of Virus-induced Gene Silencing System and
Functional Analysis of LeEIN2 Gene in Tomato

研 究 生: 傅达奇
指 导 教 师: 罗云波 教授
申请学位门类级别: 工学博士
专 业 名 称: 食品科学
研 究 方 向: 采后生物技术
所 在 学 院: 食品科学与营养工程学院

二〇〇五年六月

摘 要

近年来,植物基因组测序为我们提供了大量的序列信息,我们有必要建立大规模基因功能分析方法。反义技术常被用来抑制植物目的基因表达,但该方法需要稳定的遗传转化操作。许多物种的遗传转化比较困难,一些基因的功能缺失还将导致植物死亡。病毒诱导的基因沉默不需要遗传转化操作,可以作为敲除目的基因的一种替代方法。

番茄是研究果实成熟机理的模式材料。尽管在番茄幼苗中已经成功建立了病毒诱导的基因沉默体系,但番茄的花和果实中未见有相关报道。研究发现,最适生长条件下(22℃-28℃, 60-70 % RH)生长的番茄幼苗目的基因沉默效果不能在花和果实中观察到。但当番茄幼苗在相对较低的温度和湿度条件下(15℃-18℃, 30-40% RH)生长时,烟草脆裂病毒能有效的转移到花和果实等器官。研究发现番茄幼苗产生的 *PDS* 基因沉默效果能通过茎传递到花和果实等器官,并维持番茄植株的整个生长发育时期。*PDS* 基因沉默导致了叶片,花和果实组织中 *PDS* 基因 mRNA 水平的显著降低和前体物质八氢番茄红素的明显上升。另外,与对照相比,*PDS* 沉默叶片的叶绿素 a, 叶绿素 b 和总叶绿素含量被降低了 90% 以上,红熟期和破色期沉默番茄果实番茄红素含量降低了 98%。实验结果显示该方法便于对番茄果实发育和成熟过程中的相关基因进行大规模功能分析,是植物遗传转化的替代方法。

通过离体番茄果实的真空渗透,活体果实的果实表面,果柄和果茎注射等方式侵染番茄果实,烟草脆裂病毒在番茄果实中能有效的复制和转移。尽管上述四种方法均能对番茄果实形成有效侵染,但花后 10 天的番茄果实果柄注射是在番茄果实中建立病毒诱导基因沉默的最有效方法。对于离体果实的真空渗透,我们发现 *LeACS2* 基因沉默番茄果实的 ACC 和乙烯生成量与对照果实相比显著降低,大约有 65% 的番茄果实在真空渗透后腐烂。对于果柄注射侵染实验,我们选择乙烯信号传导途径中的 *LeCTR1* 和 *LeEILs* 两个基因为报告基因,*LeCTR1* 基因沉默促进了番茄果实成熟,而 *LeEILs* 沉默则抑制了番茄果实成熟。这些结果进一步说明了 *LeCTR1* 和 *LeEILs* 是番茄果实成熟所必须。

LeEIN2 基因沉默抑制了番茄果实的成熟。随着果实的生长发育,我们发现由于 *LeEIN2* 基因被抑制,*LeEIN2* 基因沉默番茄果实沉默部位保持绿色,不能成熟,同一果实的其它部位变成红色,对照番茄果实变红并软化。另外,*LeEIN2* 基因沉默番茄果实的绿色组织中 *E4* 基因(成熟相关基因)表达量低,与未熟期对照果实的表达模式一致,而沉默果实的红色组织具有较高的 *E4* 基因表达水平。这些结果显示 *LeEIN2* 基因在番茄果实成熟过程中扮演着重要角色。

我们第一次在番茄花和果实中建立了病毒诱导的基因沉默体系,该方法将有利于对番茄果实发育和成熟相关基因进行大规模功能分析。在番茄果实中建立的病毒诱导基因沉默体系也将便于直接在番茄果实中进行成熟相关基因的大规模和高通量分析。

关键词:烟草脆裂病毒,病毒诱导基因沉默,番茄,果实,成熟, *LeEIN2*

Abstract

In recent years, whole genome studies in plant have produced a massive amount of sequence information. It is necessary for us to find large-scale functional genomic approaches. Antisense-mediated inhibition of gene expression was commonly used to down regulate gene expression in plants. However, the approach relies on the stable transformation that is difficult in many plant species and loss-of-function of some genes results in the death at early stages of plant development. Virus-induced gene silencing (VIGS) offers recently an attractive and quick alternative for knocking out expression of a gene of interest and avoids the need for processes of transformation.

Although the efficient VIGS induced by TRV-VIGS vectors has been achieved in the seedlings of tomato plants, there is no report about the flowers and fruits of tomato, which is the most studied model for fruit ripening. We have found that the symptoms of VIGS were hardly observed in flower and fruit when the inoculated tomato seedlings were cultured under the conditions for optimum plant growth (22 °C-28 °C, 60-70 % RH), but the TRV could be efficiently transformed to the flowers and the fruit when the inoculated seedlings were cultivated at relatively low temperature at 15 °C-18 °C and low humidity 30-40% RH respectively. This paper has shown that the systemic silencing of a phytoene desaturase gene was preserved in TRV-*PDS*-inoculated tomato plant and maintained throughout flowers and fruits by the stems. Silencing of *PDS* gene results in a dramatic reduction of the levels of *PDS* mRNA and the accumulation of phytoene in the leaves, flowers and fruits of *PDS*-silenced tomato plants. In addition, the contents of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll in the leaves of *PDS*-silenced plants were reduced by more than 90% in comparison with the control plant inoculated with only TRV. The lycopene content in the yellow pulp of the *PDS*-silenced fruit was only about 2% of that in the red pulp of control fruit at breaker and red stage. The result suggests that this approach will facilitate large-scale functional analysis of genes involved in the development and ripening of tomato fruit, which is also a more rapid alternative to the stable transformation.

We report that either by syringe-infiltrating the TRV-vector into the surface, stem or carpodium of a tomato fruit attached to the plant or by vacuum-infiltrating into a tomato fruit detached from the plant, TRV can efficiently spread and replicate in the tomato fruit. Although VIGS can be performed in tomato fruit by all of the means mentioned above, the most effective method is to inject the TRV-vector into the carpodium of young fruit attached to the plant about 10 days after pollination. For vacuum-infiltration, the content of ACC (the precursor compound of ethylene biosynthesis) and the rate of ethylene production in the *LeACS2*-silenced fruit was significantly lower than those observed in control fruit (infiltrated with TRV alone). About 65% of the vacuum-infiltrated fruit (total 100 pieces) were discarded because of decay. For the infiltration from carpodium, two reporter genes related to

ethylene responses and fruit ripening, including *LeCTR1* and *LeEILs* genes, were also successfully silenced during fruit development and ripening. The suppression of the *LeCTR1* gene promotes the ripening of tomato fruit. The silencing of *LeEILs* genes inhibit fruit ripening and further supported the view that expression of *LeEILs* genes is necessary for tomato fruit ripening.

The silencing of *LeEIN2* gene results in the suppression of fruit ripening. As the fruit developed and ripened, we observed that the silenced sector of the *LeEIN2*-silenced fruit remained green and showed no ripening because of the suppression of the *LeEIN2* gene, while the other sector turned red. The control fruit turned red and softened. In addition, it was found that the *E4* gene was poorly expressed in the green tissue but highly expressed in the red tissue of the *LeEIN2*-silenced fruit. These results indicate that the *LeEIN2* gene may play a critical role in regulating tomato fruit ripening.

This is the first demonstration of VIGS in the flowers and fruits of tomato plants. This approach will facilitate large-scale functional analysis of genes involved in the development and ripening of tomato fruit, which is also a more rapid alternative to the stable transformation. The VIGS technique in tomato fruit can be also successfully applied to identify gene functions in tomato fruit, and is a powerful new tool for corresponding studies on fruit ripening.

Key Word: TRV, VIGS, Tomato, Fruit, Ripening, *LeEIN2*

缩略词表

Abbreviation

Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AS	Acetosyringone	乙酰丁香酮
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
CaMV35S	Cauliflower mosaic virus 35S promoter	花椰菜花叶病毒 35S 启动子
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide	溴代十六烷基三甲胺
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid	乙二氨四乙酸
GC	Gas Chromatography	气相色谱
GUS	β -Glucuronidase	β -葡萄糖苷酸酶
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid	2-(N-吗啡啉)乙磺酸
MOPS	3-[N-morpholino]-propanesulfanic acid	吗啡代丙烷磺酸
MS	Murashige and Skoog medium	MS 培养基
OD	Optical Density	光密度
ORF	Opening reading frame	开发阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	反转录-聚合酶链式反应
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SAM	S-adenosylmethionine	S-腺苷蛋氨酸
Tris	Hydroxy-methyl-amino Methane	三羟甲基氨基甲烷
TRV	Tobacco rattle virus	烟草脆裂病毒
VIGS	Virus-induced gene silencing	病毒诱导基因沉默
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside	5-溴-4 氯-3-吲哚- β -D-半乳糖

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

傅世奇

时间：2005 年 06 月 14 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

傅世奇

时间：2005 年 6 月 14 日

导师签名：

罗云波

时间：2005 年 6 月 14 日

第一章 文献综述与立题分析

1.1 病毒诱导基因沉默的研究进展

1.1.1 RNA 沉默的发现

基因沉默在生物界中普遍存在,可以发生在转录水平(TGS)和转录后水平(PTGS)。TGS发生在DNA水平,与目的基因启动子区域的甲基化有关。PTGS发生在RNA水平,由目的基因mRNA特异性降解所引起。RNA沉默是生物研究领域一个常用词汇,在植物学界被称为转录后基因沉默(PTGS);在动物体中被称为RNA干扰(RNAi);而在微生物中被称之为基因消除(Cogoni and Macino, 2000)。尽管RNA沉默现象在不同的生物体中的称谓有所不同,但他们却具有相似的机制。

目前, RNA干扰被普遍运用来表述不同生物体中所出现的RNA沉默现象。早在1987年,人们就发现在烟草细胞中表达反义RNA能有效抑制目的基因表达(Rothstein *et al.*, 1987)。1990年, Napoli等试图通过超量表达查耳酮合成酶基因(*CHS*)来增加矮牵牛花瓣的紫色物质,但转基因植株的花却出现杂色和白色的花瓣等特殊表型。研究表明转基因植株花的表型是由于*CHS*基因沉默阻碍了紫色物质合成所引起,这种由于超量表达所导致的目的基因沉默现象被称为共抑制。研究还发现这些现象可能不是DNA的永久性修饰所引起(Napoli *et al.*, 1990)。1994年, Cogoni等在真菌粗糙脉孢菌也发现了共抑制现象(Cogoni *et al.*, 1994)。1995年, Guo和Kemphues发现正义RNA也能促进线虫的基因沉默(Guo and Kemphues 1995)。1998, Fire 等以线虫作为研究材料,发现尽管单链反义RNA 能启动基因沉默,但双链RNA (dsRNA) 更加有效(Fire *et al.*, 1998)。经过大量的研究实验, Fire 等创造性的提出用RNA干扰(RNAi)概念来描述正义RNA所引起的线虫目的基因沉默现象。他们认为上述一系列的转基因操作所引起的基因沉默不是发生在DNA水平,而是由目的基因在mRNA水平的特异性降解所引起,被称为RNA干扰(Fire *et al.*, 1998); 现在这个词汇已被广泛接受。

除了转基因能引起目的基因的RNA沉默,病毒也是诱导植物目的基因沉默的常用方法。病毒诱导的基因沉默(VIGS)是从研究病毒和寄主或转基因之间的相互作用发展而来(Lindbo *et al.*, 1993; Kumagai *et al.*, 1995)。在这个系统中,带有目的基因片段的病毒载体被传递到植物细胞,植物细胞识别入侵病毒的威胁并且利用保护性防卫机制来摧毁病毒和病毒载体上所携带的任何外源基因,从而影响植物本身目的基因的转录过程,导致目的基因mRNA发生特异性降解(Ruiz *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001)。VIGS与转基因方法相比,操作简单,沉默效率高,节省劳力。VIGS目前被广泛应用于植物的基因功能研究,这是我们在本论文中将要重点阐述的部分。

1.1.2 RNA 沉默机制

RNA沉默属于植物的防卫反应,目前的机理研究主要集中于阐明该防卫反应所包含的基因和相关生物化学特征。RNA沉默机制在生物进化过程中相当保守,目前在动物、植物和微生物等不同生物体中都发现了参与RNA沉默的同源基因。双链RNA(dsRNA)被认为是RNA沉默的启动因子(Baulcombe, 2004)。dsRNA可以通过病毒的复制机制产生,该机制利用病毒的RNA依赖的RNA聚合酶(RdRP)(Nishikura, 2001);也可以来源于转基因所产生的发夹RNA(hpRNA)结构(Wesley *et al.*, 1999);还可以来源于反义RNA克隆策略(Cogoni *et al.*, 1994)。植物中PTGS的模式共包括三个阶段:起始阶段,维持阶段和信号扩大和传播阶段(Nishikura, 2001)。起始阶段包括小的干扰RNA (siRNAs)片段的形成和识别,植物体利用自身的转录后RNA沉默机制识别和降解目的基因dsRNA,产生大量的siRNAs(Bernstein *et al.*, 2001)。Dicer是一种具有剪切作用的酶,能从dsRNAs的末端开始识别并把它分解为21-23nt大小的siRNAs (Zamore *et al.*, 2000)。维持阶段包含基因沉默复合体(RISC)的形成过程。siRNAs作为一种引导分子在植物体内能形成RISC,该复合体是RNA和蛋白相互作用形成的大约500 kDa结构(Hammond *et al.*, 2000)。研究表明, RISC具有外切酶活性,能搜寻具有同源序列的RNA,导致目的基因的RNA沉默(Robertson, 2004)。另外RISC还具有解旋酶特性,帮助解开dsRNAs结构,通过解旋作用激活siRNA(Baulcombe, 2004)。单链siRNA能识别和降解植物体内与其有互补作用的目的基因mRNA(Nykänen *et al.*, 2001)。RNA沉默的第三阶段是RNA沉默信号扩大和传播。为了增强RNA沉默的效应, siRNAs在RNA依赖的RNA聚合酶(RdRP)的引导下,以单链的RNA为模板合成dsRNA,合成过程中siRNA扮演扩增引物的作用(Burch-Smith *et al.*, 2004)。双链RNA的重新合成为产生更多的siRNA提供了底物,从而实现了RNA沉默信号的放大,增强了RNA沉默反应,这种信号放大反应在植物体中不断的进行(Benedito *et al.*, 2004)。另外,当对照植株的幼苗嫁接到RNA沉默植株上后,随着植物的生长,对照植株也出现目的基因的RNA沉默现象,这说明RNA沉默信号在植物体中可以运动(Benedito *et al.*, 2004)。

通过研究植物PTGS突变体,我们能找到RNA沉默途径中所包含的基因。尽管我们现在还不完全了解RNA沉默的具体机制,但是我们知道VIGS和PTGS具有相同的作用机制。该机制可能为植物正常生长发育所必须,因为这些突变体会导致植物的发育异常。我们在这里提供了参与RNA沉默途径中的一些基因,如表1-1所示,从表中我们可以观察到这些基因的特征和植物突变体的表型。在线虫中由Dicer-1 (DCRI)编码的酶能激活双链RNA的剪切过程,该基因与大肠杆菌中编码RNase III的基因相关(Hammond *et al.*, 2001)。HEN1 (HUA ENHANCER1)在拟南芥中参与RNA代谢的基因,负责miRNAs (microRNAs)的聚集(Park *et al.*, 2002)。HEN1被认为与茎,叶和花的器官发育和性别分化有一定关系 (Chen *et al.*, 2002)。目前,在拟南芥PTGS 缺陷型突变体中鉴定了一个被称为RNA沉默缺陷和RNA沉默抑制的基因(SDE1/SGS2) (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000),该基因编码RNA依赖的RNA聚合酶(RdRP)。另外,在番茄中第一

次完成了RdRP 的分离和功能鉴定(Schiebel *et al.*, 1998)。RdRP合成启动PTGS的dsRNA, 转基因植株只能产生少量的siRNAs, 这显示该基因在RNA沉默的过程中扮演重要的角色(Dalmay *et al.*, 2000)。但VIGS在该突变体中反而被有效增强, 这是因为病毒能依赖自身的RdRP合成dsRNAs, 植物细胞能识别这种非典型或非正常的安排从而启动植物本身的RNA沉默机制来降解外源的病毒RNA。这进一步说明了PTGS实际上是植物的一种防卫机制, 它能有效的通过RNA沉默机制来降解外源DNA的RNA, 其中包括病毒(Mourrain *et al.*, 2000)。SDE3被认为是拟南芥中一个编码RNA解旋酶的基因, 该酶为PTGS所必须(Dalmay *et al.*, 2001)。但是, SDE4突变体有非常显著的表型, 它可能参与DNA的甲基化(Hamilton *et al.*, 2002)。AGO1 (ARGONAUTE1) 突变体降低了拟南芥二级生长点的数目, 导致了花的败育, 这主要是花的发育缺陷所引起 (Bohmert *et al.*, 1998)。AGO 基因家族的成员被认为与在多个真核生物的组蛋白修饰和转录水平的基因沉默相关 (Mochizuki *et al.*, 2002; Pal-Bhadra *et al.*, 2002; Taverna *et al.*, 2002)。

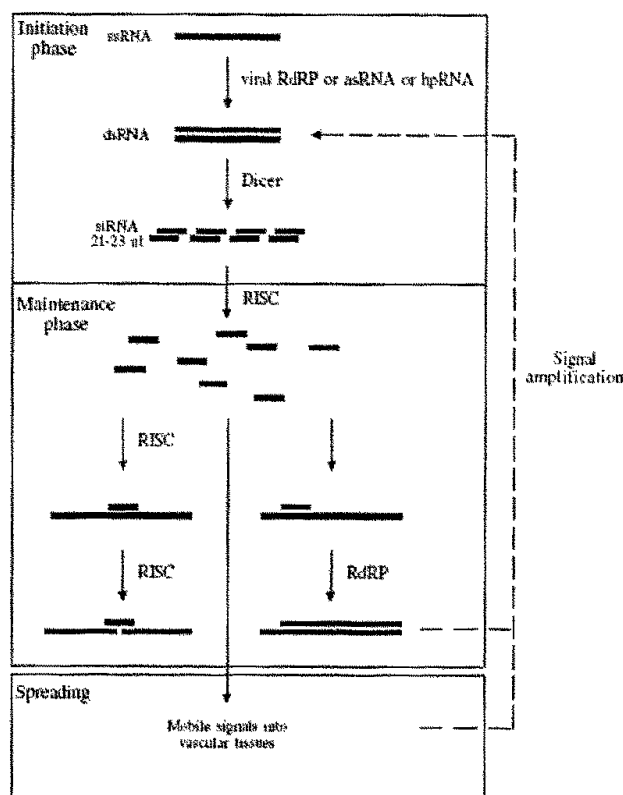


图1-1 转录后基因沉默模式图

Fig. 1-1. Current model of post-transcriptional gene silencing (Benedito *et al.*, 2004)

表 1-1 转录后基因沉默途径中所包含的基因

Table 1-1 Gene involved in post-transcriptional gene silencing				
拟南芥基因	功能区域	蛋白功能	突变体表型	参考文献
<i>AGO1</i>	PAZ	蛋白之间作用	减少植物二级生长点	Bohmert <i>et al.</i> , 1998
<i>AGO4</i>	PPD	蛋白之间作用	SUP 沉默抑制	Zilberman <i>et al.</i> , 2003
<i>DCL1</i>	PAZ	蛋白之间作用	植物发育异常	Finnegan <i>et al.</i> , 2003
<i>SIN1/SUS1</i>	RNaseIII	Dicer	胚珠发育异常	Golden <i>et al.</i> , 2002
<i>EMB761CAF</i>	RNA 解旋酶	RNA 解旋	降低 miRNA 的聚集	Park <i>et al.</i> , 2002
<i>HEN1</i>	新	不清	改变叶的表型	Park <i>et al.</i> , 2002
<i>SDE1/SGS2</i>	RDRP	RNA 聚合作用	叶的发育缺陷	Dalmay <i>et al.</i> , 2000
<i>SDE2</i>	不清	不清	叶的发育缺陷	Mourrain <i>et al.</i> , 2000
<i>SDE3</i>	RNA 解旋	RNA 解旋作用	影响 PTGS	Hamilton <i>et al.</i> , 2002
<i>SDE4</i>	不清	不清	抑制 DNA 甲基化	Hamilton <i>et al.</i> , 2002
<i>SGS1</i>	不清	不清	影响 PTGS	Elmayan <i>et al.</i> , 1998
<i>SGS3</i>	XS 卷曲螺旋	蛋白之间作用	与 SGS2 突变体一致	Mourrain <i>et al.</i> , 2000

1.1.3 VIGS 优缺点

分子生物学的发展让我们掌握了高通量获得植物新基因信息的方法，例如基因组测序，基因芯片以及差势筛选技术等(Richmond and Somerville 2003; Zegzouti *et al.*, 1999)。但获得序列只是我们了解和掌握该基因的第一步，更重要的是完成该基因的功能鉴定。为了符合大规模基因测序的形势，分子生物学家正在寻找高通量基因功能鉴定方法。过去，反义转基因技术是研究植物基因功能的常用和有效方法，但该方法需要组织培养步骤来产生转基因植株(Herrera-Estrella *et al.*, 2005; Baulcombe, 1999)。双链互补基因结构有效提高了转基因植株中目的基因的抑制效率(Wesley *et al.*, 2001)，但该方法仍然需要转基因操作。VIGS 体系不需要耗时的遗传转化和组织培养程序，能作为目的基因反向遗传学研究的潜在重要工具，加速基因的功能分析。VIGS 技术和传统的转基因技术相比具有如下优势。一，操作简单。VIGS 只需进行农杆菌的浸染就能取得良好的效果，不需要复杂的遗传转化。二，节省时间。VIGS 一般 2-3 周就有比较明显的效果，转基因需要获得转基因植株，需要完成复杂的传代鉴定工作，一般需要 1-2 年。三，现在开发的病毒载体能运用于单子叶和双子叶植物。植物的转基因具有很强的选择性，单子叶的遗传转化有一定困难，如向日葵；四，对目的基因没有选择性，可以用来研究与植物生长发育的任何基因。转基因不适合研究胚胎发育早期的基因，该基因的抑制导致植株的死亡。五，便于研究基因家族各个成员之间的功能。设计好的目的基因片段，VIGS 能特异地沉默单个或多个基因，能解决基因家族的冗余性问题。六，VIGS 能有效地应用于抗病信号传导中各个基

因的功能研究,目前,已经成功的运用于 N 端抗性的研究领域(Liu *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002)。七, VIGS 可以运用于功能基因组研究。有报道说,在烟草中使用 TMV 病毒载体和在大麦中使用 BSMV 病毒,能进行基因的高通量筛选(Fitzmaurice *et al.*, 2002)。在烟草中采用 VIGS 筛选了 5000 个基因,发现 100 个与烟草的细胞死亡有关,进一步研究发现,其中有 10 个与烟草的抗病性有直接的关系,另外 90 个基因与细胞的死亡没有直接关系(Lucioli *et al.*, 2003)。Rui 等利用马铃薯病毒 PVX 建立了一个文库,进行 VIGS 的高通量筛选了 4992 个 CDNA 克隆获得了一个新的热激蛋白基因 HSP90 (Rui *et al.*, 2003)。目前,耶鲁大学把通量克隆技术(gateway)与 TRV 病毒载体有机结合创造了一个新的载体,该载体可以用于 EST 的功能鉴定(Liu *et al.*, 2002)。

但是到目前为止,只是在很有限的几种植物中建立了 VIGS 体系,例如烟草(Liu *et al.*, 2004),番茄(Liu *et al.*, 2002),矮牵牛(Chen *et al.*, 2004),胡椒(Chung *et al.*, 2004),豆类(Constantin *et al.*, 2004)和马铃薯(Faivre-Rampant *et al.*, 2004)等。另外,目前的研究主要集中在植物的幼苗中建立 VIGS 体系,花和块茎等繁殖器官也有报道,但果实中未见有相关报道。果实是植物的繁殖器官,具有重要的经济价值。果实中 VIGS 的建立将有利于加快有关果实成熟机理的研究进程。

表1-2 VIGS与其它基因功能鉴定方法的比较 (Burch-Smith *et al.*, 2004)

Table 1-2 Comparison of VIGS with other functional genomics approaches						
方法	描述	转基因	空间	机理	研究基因家族	费用
病毒诱导基因沉默	农杆菌侵染	否	小	RNA沉默	能	低
物理/化学诱变	EMS或同位素处理	否	大	点突变	否	高
TILLING	化学诱变剂处理通过	否	大	点突变	否	高
	SNP分析突变体					
T-DNA插入突变	获得转基因植株	需要	大	插入突变	否	适中
转座子激活	获得含有转座子的转基因植株	需要	大	插入突变	否	适中

1.1.4 VIGS 载体

病毒载体特征决定VIGS在植物体所影响的区域。病毒载体通过植物的运输系统由侵染区域转运到植物的其它大部分组织,但绝大部分病毒不能侵染植物生长点(Peele *et al.*, 2001)。病毒载体的一些重要特征决定了它诱导植物出现基因沉默的能力:包括病毒感染植物生长点并诱导其出现基因沉默的能力;病毒基因组大小;病毒载体的核酸类型和基因组组成;病毒载体的寄主范围等。另外,在运用病毒载体时,我们还应考虑病毒载体对个人和环境的安全性问题。烟草花叶病毒(TMV)是植物中第一个被运用的VIGS病毒载体(Kumagai *et al.*, 1995)。马铃薯X型病毒(PVX)能把目的基因传递到植物的细胞并且启动植物的VIGS,但却不能侵染植物的生长点,严

重限制了该载体发展(Ruiz *et al.*, 1998)。烟草脆裂病毒(TRV)能有效的把沉默信号传递到植物的生长点,为研究植物发育器官中的基因功能提供了可能(Ratcliff *et al.*, 2001)。TRV是一种双链RNA病毒,由RNA1和RNA2两条单链RNA组成。RNA1编码RNA依赖的RNA聚合酶, RNA2编码外壳蛋白,目的基因片段被插入到RNA2结构(Angenent *et al.*, 1986; MacFarlane, 1999)。把TRV病毒的基因组构建到双价表达载体,同时结合农杆菌的侵染特性,大大方便了VIGS的侵染程序(Liu *et al.*, 2002)。当采用农杆菌侵染方法时,该病毒的两个基因组结构被转入到各自独立的农杆菌中,目的基因片段被克隆到RNA2的结构上,两者混合后对植物的叶片进行共侵染。与其它病毒载体相比,TRV病毒载体叶片侵染方便快捷,侵染后数天就能导致植物出现目的基因沉默表型;能侵染植物的生长点,可能会导致植物繁殖器官的基因沉默;与通量克隆技术结合(gateway),TRV还能实现目的基因的高通量功能分析(Liu *et al.*, 2002)。目前,TRV病毒载体在烟草,番茄等茄科植物上运用取得了良好的效果,但不适合拟南芥等模式材料。大麦条纹花叶病毒(BSMV)成功的诱导了大麦,水稻和玉米等单子叶植物中八氢番茄红素去饱和酶基因(*PDS*)沉默(Holzberg *et al.*, 2002)。卫星病毒必须借助辅助病毒的基因组信息在植物体中复制和运动。一个建立在卫星烟草花叶病毒(STMV)的VIGS体系最近被报道,该体系使用烟草花叶病毒(TMV)的U2菌株作为辅助病毒(Gosselé *et al.*, 2002)。

除了RNA病毒,DNA病毒也是基因沉默载体的良好来源。DNA病毒不能广泛的用作基因沉默载体,较大的基因组结构限制了病毒的运动(Palmer *et al.*, 2001)。双生病毒载体可以侵染植物组织,是一种非常前景的病毒载体(Fofana *et al.*, 2004)。甘蓝叶曲双生病毒(CbLCV)也是一个非常有潜力的VIGS载体,是拟南芥中第一个被运用的病毒载体。番茄金黄色花叶病毒(TGMV)载体有效的诱导了*PCNA*(PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN)基因的沉默(Peele *et al.*, 2001),该基因是烟草生长点DNA复制所需要的一个关键基因,该基因的转基因操作导致植物死亡(Kjemtrup *et al.*, 1998)。番茄金黄色花叶病毒(TGMV)和白菜卷曲病毒(CaLCuV)在植物的细胞核中利用寄主DNA复制机制,诱导植物目的基因的RNA沉默。在不同植物中建立VIGS体系,一般选用*PDS*基因作为报告基因,沉默表型容易用肉眼观察。

1.1.5 病毒侵染方式

在获得了良好的病毒载体以后,必须采用合适的侵染方法才能获得好的沉默效果。目前,根据已经发表的文章归纳起来主要有以下几种侵染方法(傅达奇等, 2005)。一,机械伤口侵染。该方法主要是采用体外转录或从侵染叶片中提取获得的病毒载体RNA为侵染物。采用牙签或者是石英沙处理待侵染的叶片获得伤口。马铃薯病毒(PVX)早期就采用这种方法,该方法操作比较复杂,但沉默效果好,尤其是对于象拟南芥这些不适合采用其它方法的植物(Ratcliff *et al.*, 2001)。二,农杆菌侵染。该方法主要是利用了农杆菌对双子叶植物的良好侵染特性。带有目的基因的病毒载体随着农杆菌的侵染进入植物的组织,建立了一种瞬时表达体系,有效的诱导了VIGS。农杆菌在侵染植物叶片的时候主要采用不带针头的注射器注射,高压叶面喷洒和叶面的

真空渗透(Burch-Smith *et al.*, 2004)。该方法除了运用与 DNA 和 RNA 病毒, 还用于建立了在植物体中成功瞬时表达外源蛋白的体系。三, 微粒轰击也是一种把病毒载体导入植物材料的良好方法, 该方法主要运用于 DNA 病毒(Muangsan *et al.*, 2004)。良好侵染方法的选择取决于植物材料和病毒载体的特性。

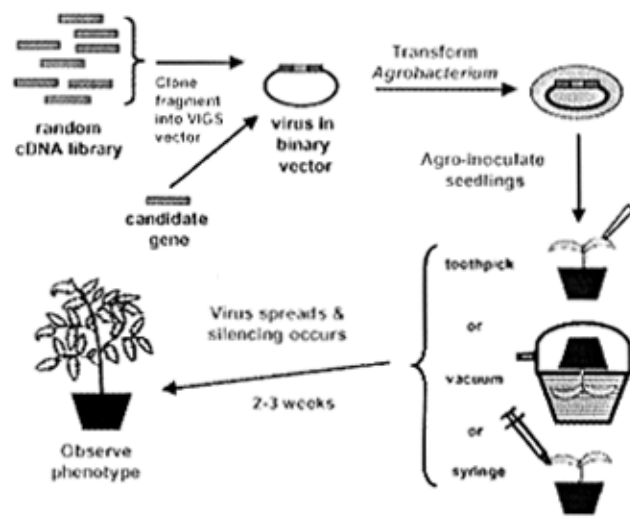


图1-2 高通量病毒诱导基因沉默方法 (Burch-Smith *et al.*, 2004)

Fig. 1-2. Method for high-throughput virus-induced gene silencing (VIGS)

1.1.6 VIGS 的应用

VIGS 技术是一种非常精致的基因功能鉴定方法, 已被用来鉴定植物中各式各样的基因 (Bilgin *et al.*, 2003; Burton *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003)。VIGS 与生物化学和遗传学方法相结合, 将加速植物体目的基因功能的研究步伐。到目前为止, 烟草仍是 VIGS 运用的主要模式植物。与其它植物相比, 烟草比较容易通过农杆菌介导的叶盘法获得转基因植株。而且自花受粉, 开花比较快, 和比较小的株高, 与拟南芥相比, 烟草病毒症状缓和, 而且具有较多的叶片可以用于生物化学分析。除了烟草, VIGS 也能运用于其它植物, 如烟草脆裂病毒(TRV)就成功的运用于番茄(Liu *et al.*, 2002), 胡椒(Chung *et al.*, 2004), 矮牵牛(Chen *et al.*, 2004)等植物, BSMV 运用于大麦等单子叶植物(Holzberg *et al.*, 2002)。除了 RNA 病毒之外, 目前开发的 DNA 病毒在拟南芥中运用取得了良好的效果, 如双生病毒(Peele *et al.*, 2001; Turnage

et al., 2002)。大部分病毒不能侵染植物生长点，限制了病毒载体在植物中的运用，但 TRV 能有效的侵染植物组织生长点(Liu *et al.*, 2002)。另外，VIGS 直接运用植物的繁殖器官存在一定的难度，这可能是由于病毒很难直接侵染植物的繁殖器官和病毒基因沉默的瞬时效应所致。最近研究报道用马铃薯病毒载体 PVX-*PDS* 侵染叶片，在经过三代 120 天后，发现马铃薯块茎中的 *PDS* 基因也受到显著的抑制，这为我们在植物的繁殖器官中运用 VIGS 提供了光明的前景(Odile *et al.*, 2004)。最近，花器官和根的基因沉默也报道(Liu *et al.*, 2004; Valentine *et al.*, 2004)。由表 1-3 可以看出目前应用比较多的病毒为 TRV 和 PVX，运用最广泛的植物寄主为烟草。

表1-3 VIGS在植物体中的应用情况 (Robertson, 2004; 傅达奇等, 2005)

Table 1-3 Applications of Virus-induced gene silencing in plants					
目的基因	病毒	寄主植物	目的基因	病毒	寄主植物
<i>NbPDS</i>	TMV	烟草	<i>NbChl1</i>	TGMV	烟草
<i>NbPDS</i>	PVX	烟草	<i>NbCesA</i>	PVX	烟草
<i>NbPCNA</i>	TGMV	烟草	<i>NbCDPK2</i>	PVX	烟草
<i>LeCTR1, LeCTR2</i>	TRV	Micro-tom 番茄	<i>AtChl1, AtPDS</i>	CaLCuV	拟南芥
<i>NbChlH</i>	TMV	烟草	<i>HvPDS</i>	BSMV	大麦
<i>WIPK, SIPK</i>	PVX	35S-N 转基因烟草	<i>HvPDS</i>	TMV	烟草
<i>NtCDPK1</i>	PVX	烟草	<i>P58(IPK)</i>	PVX	烟草
<i>NbEDS</i>	TRV	烟草	<i>NbFtsH</i>	PVX	烟草

注解：TMV：烟草花叶病毒；PVX：马铃薯X型病毒；TGMV：番茄金黄花叶病毒；TRV：烟草脆裂病毒；CaLCuV：甘蓝卷叶病毒；BSMV：大麦条纹花叶病毒

一些基因的功能缺失突变将导致植物的胚胎死亡（例如 *PCNA* 基因，该基因是植物 DNA 复制所必须的，该基因的突变将影响染色体的稳定性）。VIGS 技术能有效的应用于植物抗病信号传导途径中相关基因的功能鉴定(Peart *et al.*, 2002; Romeis *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002)。用于拟南芥的病毒载体目前有很多限制，他需要从受侵染的烟草中提取获得病毒，而且侵染后病毒症状很严重。如果对病毒载体和寄主植物的突变做一些改造可能会增加病毒对拟南芥诱导基因沉默的效率。

1.1.7 VIGS 的抑制

植物采用 RNA 沉默机制阻止病毒在植物体内的聚集，相反，病毒也能采用相应的对策来对抗这种作用。病毒对抗植物 RNA 沉默的最基本机制是编码各种基因沉默抑制蛋白。这些抑制蛋白在进化过程中没有保守性，因为在不同病毒中发现的抑制蛋白具有不同的结构特征和不同的序列单元。

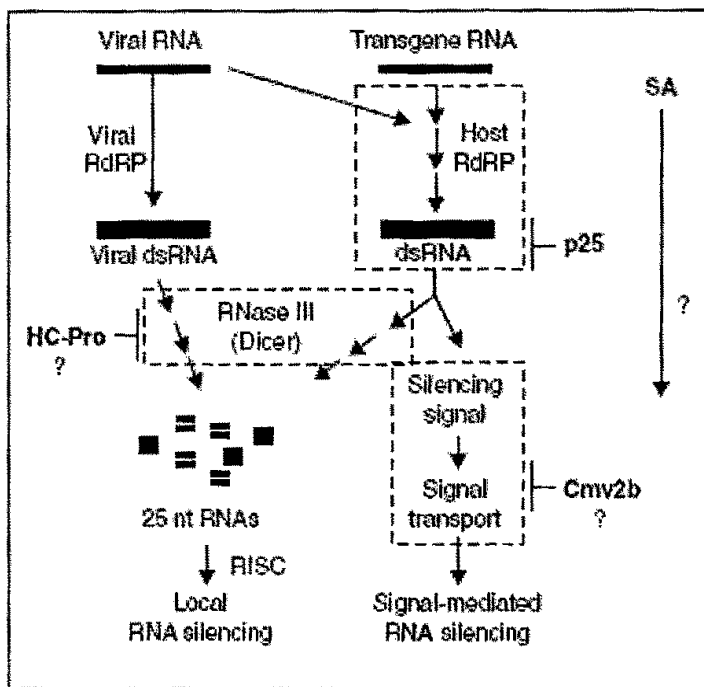


图 1-3 病毒诱导基因沉默的抑制

Fig. 1-3. The suppression of Virus-induced gene silencing (Li and Ding, 2001)

HC-Pro, P1 和 AC2 抑制蛋白分别来源于马铃薯病毒, 水稻黄斑南方菜豆花叶病毒和非洲木薯花叶双生病毒(Fofana *et al.*, 2004)。它们能抑制 GFP 转基因植株中的 GFP 基因沉默, 增强转基因植株的荧光强度, 在转 GUS 基因的转基因烟草中也发现相同现象。研究发现 HC-Pro 能抑制 21-25nt 小片段的积聚, 但不阻止沉默信号的产生和系统性转移, 因此该类型的抑制蛋白是作用于 21-25nt 产生的上游 (Mallory *et al.*, 2001)。Cmv2b 是一种来源于黄瓜花叶病毒的基因沉默抑制因子, 通过抑制沉默信号的系统性转移而起作用(Baulcombe, 2004)。来源于黄瓜花叶病毒和番茄丛矮病毒的 Tav2b 和 p19 抑制蛋白和 Cmv2b 具有相同的抑制机理(Brigneti *et al.*, 1998)。p19 蛋白形成的二聚体结合在 siRNA 的配对碱基区域, 这样导致 siRNA 或者 miRNA 不能形成基因沉默复合体(RISC)(Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004)。在表达 p19 的拟南芥转基因植株中, miRNA 和互补 miRNA 大量聚集, 然而在对照植株中, 缺乏 miRNA。miRNA 双螺旋复合体是 miRNA-RISC 复合体的前提, 而且其生命周期很短(Pfeffer *et al.*, 2004)。但是该前体在 p19 存在的情况下变的更加稳定。p25 是马铃薯病毒编码的一种 25kd 的蛋白, 用含有 35S-PVX:GFP 病毒载体的农杆菌侵染转基因烟草植株, 出现目的基因沉默。如果采用含有 35S-PVX:GFP 和 35S-25K 病毒载体的农杆菌共同侵染则出现 GFP 基因沉默的抑制现象。p25 编码蛋白可能作用于系统性信号产生的上游。通过该蛋白的研究, 发现马铃薯病毒 PVX 在烟草中诱

导产生的 RNA 沉默可能有两种类型,一种是依赖 p25 编码蛋白,另一种是 p25 编码蛋白非依赖型的(Voinnet *et al.*,2000)。由此可见, RNA 沉默有两种类型,一种沉默只发生在侵染部位,而另一种可以形成系统性转移。虽然这些抑制基因可能对 VIGS 时有负面效果,但在农杆菌介导的蛋白瞬时体系中,可以利用这些抑制蛋白基因和病毒载体共侵染,通过抑制待表达目的蛋白基因的基因沉默来有效的增强目的蛋白的表达水平。VIGS 的抑制机理如图 1-3 所示:

1.2 乙烯生物合成和信号传导的研究进展

1.2.1 乙烯生物合成

乙烯作为一种内源激素调控植物多种生理活动,包括种子萌发、性别分化、器官脱落和果实成熟等(Bleecker, 2000; 傅达奇等 2002)。在植物体内,乙烯合成来源于蛋氨酸, ACC 是乙烯合成的直接前体, SAM 合成酶, ACC 合成酶, ACC 氧化酶催化反应是乙烯生物合成途径的重要步骤(Bleecker and Kende 2000)。除了合成 ACC,还存在分支途径合成新的蛋氨酸,维持乙烯合成对底物蛋氨酸的需求(Bleecker and Kende 2000; Kende, 1993)。ACC 合成酶基因和 ACC 氧化酶基因均由基因家族组成,各个成员具有不同的表达模式(Kende, 1993; Zarembinski and Theologis 1994; Barry *et al.*, 2000; Llop-Tous *et al.*, 2000)。目前在番茄中克隆了 9 个 ACC 合成酶基因(*LEACS1A*, *LEACS1B* 和 *LEACS2±7*) (Zarembinski and Theologis, 1994; Oetiker *et al.*, 1997; Shiu *et al.*, 1998)。其它植物中 ACC 合成酶基因克隆也有报道,如柠檬,黄瓜和柑橘等(Yamamoto *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1999)。番茄果实是研究乙烯生物合成和信号传导的模式材料。*LeACS2* 和 *LeACS4* 在番茄果实成熟过程中特异性表达(Rottmann *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1991; Yip *et al.*, 1992; Lincoln *et al.*, 1993; Barry *et al.*, 2000); *LeACS1A* 和 *LeACS6* 在番茄果实成熟过程启动之前表达(Barry *et al.*, 2000)。通过分析乙烯信号传导阻断的番茄突变体中 ACS 基因家族的表达模式,我们可以确定受乙烯调控的 ACS 基因。*Nr* 突变体不能感受乙烯,该突变体的乙烯结合区域发生突变导致编码蛋白不能结合乙烯 (Lanahan *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 1995)。成熟抑制突变体(*rin*)番茄果实不能完成乙烯生物合成的自我催化过程,同时该突变体阻止番茄果实成熟相关基因的表达(Vrebalov *et al.*, 2002)。*Nr* 和 *rin* 突变体果实研究表明 *LeACS2* 基因表达需要乙烯,而 *LeACS1A* 和 *LeACS4* 的表达则不受乙烯调控(Barry *et al.*, 2000)。*LeACS1A* 和 *LeACS6* 在绿熟期番茄果实中负责系统 I 的合成(Barry *et al.*, 2000),系统 I 乙烯的合成伴随番茄果实的整个发育过程。在系统 I 乙烯和系统 II 乙烯合成的过渡时期, *LeACS1A* 表达增加, *LeACS4* 被诱导表达(Barry *et al.*, 2000)。*LeACS2* 基因的表达维持番茄果实成熟过程中系统 II 乙烯的合成(Barry *et al.*, 2000)。*LeACS2* 基因的反义抑制使得乙烯的合成下降为 0.1%,导致果实的不成熟表型(Oeller *et al.*, 1991)。

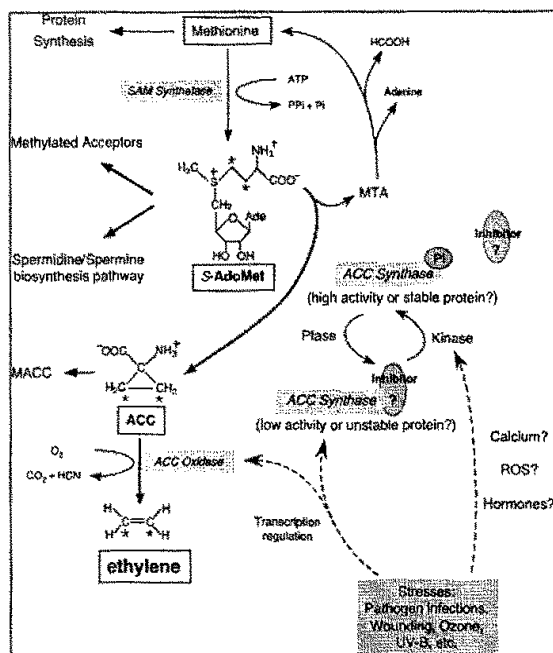


图 1-4 乙烯的生物合成及调控

Fig. 1-4. Biosynthesis pathway and regulation of ethylene (Wang *et al.*, 2002)

研究表明ACS基因编码蛋白通过磷酸化作用调节乙烯的合成过程(Spanu *et al.*, 1994; Raz, 1995)。拟南芥ACS5的C端突变(eto2-1)导致了乙烯的大量产生(Vogel *et al.*, 1998)。有研究认为ETO编码蛋白在体外与ACS5编码蛋白结合, 导致ACS5编码蛋白的降解, 从而有效的抑制了ACS酶的活性, 减少乙烯的合成量(Tatsuki and Mori, 2001)。ACS编码蛋白的磷酸化能阻止ETO编码蛋白的降解作用, 导致ACS酶活性的上升(Tatsuki and Mori, 2001)。ACC合成酶是控制乙烯生物合成的关键步骤, 但ACC氧化酶在乙烯的合成调控过程中也起着重要的作用(Yang and Hoffman, 1984; Theologis *et al.*, 1993)。在跃变型果实出现跃变之前用外源乙烯处理番茄果实, ACC酶活性的上升先于ACC合成酶, 这说明ACO活性在控制乙烯的生物合成途径中发挥着重要作用(Lui *et al.*, 1985)。另外, ACO基因家族在番茄不同组织和不同的发育阶段的表达模式说明了该基因家族在番茄果实成熟过程中对乙烯的合成起着重要的调控作用(Holdsworth *et al.*, 1988; Hamilton *et al.*, 1990; Balague *et al.*, 1993; Barry *et al.*, 1996)。第一个被鉴定的ACO基因是通过研究转反义基因et al., 1988)。pTOM13转基因植株抑制了乙烯的生物合成量和ACO的酶活性(Hamilton *et al.*, 1990)。在细菌中表达pTOM13基因的实验进一步说明该基因编码蛋白能催化ACC形成乙烯(Hamilton *et al.*, 1991; Spanu *et al.*, 1991)。进一步的研究表明该基因在番茄花和叶片的衰老以及果实成熟的过程中表达增强, 而且该基因受伤

信号的诱导(Holdsworth *et al.*, 1988; Nakatsuka *et al.*, 1998; Llop-Tous *et al.*, 2000)。乙烯生物合成的第一步骤首先是ACO1基因的表达,产生的乙烯诱导了ACC合成酶基因的表达,从而进一步的诱导了乙烯的大量合成。乙烯的生物合成途径如图 1-4所示。

1.2.2 乙烯信号传导

乙烯合成以后,通过信号传导调节相关基因的表达。通过分析拟南芥的乙烯三重反应突变体,乙烯信号传导途径中的许多元件被成功分离和鉴定。乙烯只有通过与乙烯受体蛋白结合才能参与乙烯信号传导途径。研究发现,乙烯受体与细菌的双组分受体同源。细菌中该受体蛋白由感受蛋白和分离的反应调节蛋白组成,两者一起调节作用,允许细菌对不同的环境刺激条件作出反应(Chang and Stewart, 1998)。乙烯受体结合乙烯需要铜离子的参与(Rodriguez *et al.*, 1999)。乙烯的存在瞬时增强了体外多肽的磷酸化作用,说明乙烯信号通过受体的磷酸化作用传递到下游组件(Raz and Fluhr, 1993)。目前在番茄中至少克隆了六个乙烯受体, *LeETR1*, *LeETR2* (Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998), *NR* (Wilkinson *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1996), *LeETR4*, *LeETR5* (Tieman and Klee, 1999), 和 *LeETR6* (Ciardi and Klee, 2001)。番茄乙烯受体家族各成员之间存在不同的表达模式: *LeETR1*和*LeETR2* 在番茄各个时期和不同组织中组成型表达, *NR* 和 *LeETR4*在果实成熟,衰老和脱落组织中表达增强(Payton *et al.*, 1996; Tieman *et al.*, 2000)。 *LeETR5* 在番茄果实,花中表达并且受外界病原体刺激表达增强(Tieman and Klee, 1999)。在没有乙烯存在的条件下,ETR1蛋白以二聚体的形式存在,受体保持活性状态对乙烯信号传导起负调控作用。当乙烯和受体结合以后,磷酸化作用使得二聚体乙烯受体蛋白成为单体,促进乙烯信号传导途径(Muller-Dieckmann *et al.*, 1999)。乙烯受体的表达受乙烯所诱导,受体的表达增强降低了植物对乙烯的敏感性,这些结果进一步阐明乙烯受体的负调控模型(Ciardi *et al.*, 2000)。减少Nr基因表达对乙烯的信号传导并没有明显的影响, Nr 转基因植株的*LeETR4*基因表达与正常番茄植株相比明显增强,这预示着*LeETR4*和Nr基因在表达模式上存在互补作用,及*LeETR4*基因表达增强能弥补转基因所引起的Nr基因表达减少(Tieman *et al.*, 2000)。相反,以Nr突变体为材料的Nr转基因植株能恢复不成熟表型,预示着Nr基因并不是番茄果实成熟过程中所必须的,进一步的证明了乙烯信号传导途径中的抑制模型(Hackett *et al.*, 2000)。

除了乙烯受体基因之外,同时还分离了乙烯信号传导途径中的一些其它元件。*CTR1*位于乙烯受体的下游,编码一蛋白激酶,被认为与MAP3K激酶同源(Kieber *et al.*, 1993)。*CTR1*是乙烯信号传导途径中的负调控因子,该基因的突变能导致拟南芥组成型乙烯三重反应(Clark *et al.*, 1998)。现有乙烯信号传导途径模型认为当缺乏乙烯的情况下,乙烯受体负调控*CTR1*的作用,从而打断了乙烯的信号传导途径;当乙烯与受体结合,消除了受体的负调控作用,从而促进了乙烯的信号传导途径(Bleecker *et al.*, 1998)。*ER50*是一个与*CTR1*同源的基因,这预示这在乙烯信号传导途径中存在多个MAP3Ks基因(Zegzouti *et al.*, 1999)。在番茄果实中*LeCTR1*基因的表达受

乙烯诱导表达增强, 而且受果实成熟过程调控, 这预示着 *LeCTR1* 基因和 *CTR1* 基因一样在乙烯信号传导途径中起负调控作用(Zegzouti *et al.*, 1999)。

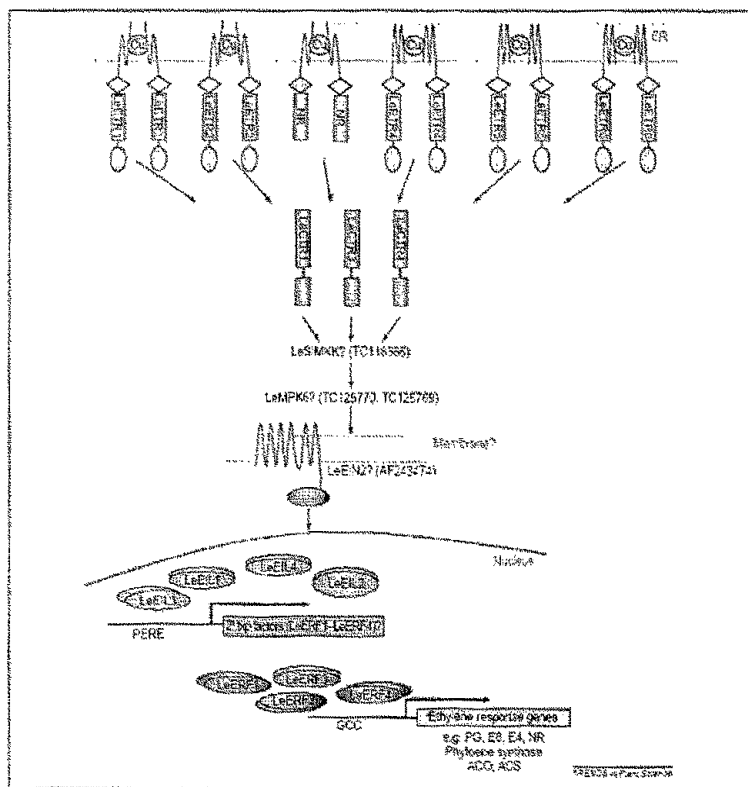


图 1-5 番茄中乙烯感受和信号传导

Fig. 1-5. Ethylene perception and signal transduction in tomato (Lori *et al.*, 2004)

EIN2, 一个未知功能的膜蛋白, 该蛋白的N端结构与哺乳动物的金属离子转运蛋白NRAMP具有很高的同源性, 该基因在乙烯信号传导途径中起着重要作用(Alonso *et al.*, 1999)。 *EIN3* 和 *EIN3-like (EIL)* 基因编码蛋白在乙烯信号传导途径中位于 *EIN2* 基因的下游, 属于转录因子家族成员(Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 1999)。 *EIN3*, *EIL1* 和 *EIL2* 基因编码蛋白特异性地与乙烯反应因子基因 *ERF* 结合。 *ERF* 在转录水平调节目的基因表达, 该基因编码是一种DNA结合蛋白, 属于乙烯反应元件结合蛋白(EREBP)(Solano *et al.*, 1998)。通过与该类基因启动子区域的GCC结构特异性结合, EREBP的结合能激活大量的乙烯反应基因和病程相关基因的表达(Guo and Ecker 2004)。 *ERN1* 位于 *EIN3* 基因的下游, 是乙烯信号传导途径中的负调控因子, 编码蛋白在细胞核内起作用(Trentmann, 2000)。目前在番茄中也克隆了4个与拟南芥基因 *EIN3* 同

源的基因*LeEIL1±3*,该类基因在调节乙烯反应中起着重要作用(Tieman *et al.*, 2001)。通过降低该基因家族的一个或多个成员获得的转基因植株表型研究证明该基因家族成员之间存在功能互补作用,该类基因对乙烯信号传导途径起着正向调控作用(Tieman *et al.*, 2001)。番茄中的乙烯信号传导途径如图 1-5所示:

1.2.3 番茄果实成熟的乙烯调控

随着果实成熟的进程,许多成熟相关的基因开始表达或出现表达增强的趋势。通过分析番茄突变体或者转基因材料果实中的基因表达情况,可以把成熟相关基因分为两大类,乙烯依赖型和乙烯非依赖型(DellaPenna *et al.*, 1989; Oeller *et al.*, 1991; Theologis *et al.*, 1993; Picton *et al.*, 1993)。通过研究转反义*ACO*基因植株的成熟相关cDNA的表达模式来确定哪些成熟基因与乙烯相关,而那些与乙烯不相关(Picton *et al.*,1993)。有报道认为某些成熟相关基因对微量的乙烯含量敏感(Lincoln and Fischer, 1988b; Sitrit and Bennett, 1998),在转基因番茄果实中的存在的微量乙烯能影响成熟相关基因的表达模式(Theologis *et al.*, 1993; Klee, 1993; Picton *et al.*, 1993; Sitrit and Bennett, 1998)。

表 1-4 番茄中受乙烯诱导表达增强的成熟相关基因

Table 1-4 some examples of ripening related genes that exhibit ethylene-enhanced expression in tomato			
基因	同源基因	功能	参考文献
<i>LeACS2</i>	ACC 合成酶基因	催化系统 II 乙烯合成	Barry <i>et al.</i> , 2000
<i>LeACS6</i>	ACC 合成酶基因	催化系统 I 乙烯合成	Barry <i>et al.</i> , 2000
<i>LeACO1,3</i>	ACC 氧化酶基因	催化乙烯的生物合成	Barry <i>et al.</i> , 1996
<i>E4</i>	双加氧	未知	Lincoln <i>et al.</i> , 1987
<i>E8</i>	双加氧	未知	Lincoln <i>et al.</i> , 1987
<i>ER24</i>	转录共激活因子 MBF1	与 TATA 结构结合	Zegzouti <i>et al.</i> , 1999
<i>ER49</i>	转录延伸因子 EF-Ts	转录后调控	Zegzouti <i>et al.</i> , 1999
<i>ER68</i>	RNA 解旋酶 DBP2	转录后调控	Zegzouti <i>et al.</i> , 1999
<i>ER50</i>	拟南芥 CTR1	乙烯信号传导负调控	Zegzouti <i>et al.</i> , 1999
<i>LeRab11a</i>	Rab GTP 酶基因	植物细胞壁修饰	Lu <i>et al.</i> , 2001
<i>TomlaxA,B,C</i>	脂肪氧化酶基因	过氧化作用	Griffiths <i>et al.</i> , 1999
<i>PG</i>	多聚半乳糖醛酸酶基因	果胶解聚作用	Nicholass <i>et al.</i> , 1995
<i>PME</i>	果胶甲基酯酶基因	维持软化果实硬度	Hall <i>et al.</i> , 1994
<i>LeEXP1</i>	扩展酶基因	破坏氢键	Rose <i>et al.</i> , 1997

分析成熟相关基因的启动子的区域结构能揭示乙烯调节果实成熟相关基因的机理。乙烯能刺

激 $E4$, $E8$ 基因的表达(Lincoln *et al.*, 1987; Giovannoni, 2001)。 $E4$ 基因在叶子中被乙烯诱导, 但 $E8$ 基因在叶子中不受乙烯的诱导, 由此可以推断乙烯诱导基因的表达具有组织特异性和发育特异性(Lincoln and Fischer, 1988a)。尽管 $E4$, $E8$ 基因在番茄成熟过程中的功能目前尚不清楚。转反义 $E8$ 基因的转基因植株导致乙烯合成量的增加, 这预示着番茄果实成熟过程中乙烯生物合成存在反馈调控(Kinsion and Deikman, 1996)。 $E4$ 基因启动子的分析发现乙烯反应基因需要两个基本的共同顺式结构单元, 一个上游调控元件和一个下游调控元件(Xu *et al.*, 1996)。 $E4$ / $E8$ BP 结合蛋白与 $E4$ 和 $E8$ 基因的启动子区域序列结合(Cordes *et al.*, 1989)。 $E4$ 基因的 $E4$ / $E8$ 结合蛋白结合区域突变分析表明该基因调节 $E4$ 基因的表达, 同时说明该序列为乙烯反应基因的作用区域(Xu *et al.*, 1996)。 $E4$ / $E8$ BP-1是随后被克隆的一个新基因, 该基因在果实中具有较高的表达水平而且随着果实的成熟过程出现表达增强的现象, 说明该基因在番茄果实成熟过程中起着重要作用(Coupe and Deikman, 1997)。多聚半乳糖酶基因(PG)被认为在启动子区域也存在与 $E4$ 和 $E8$ 基因启动子区域相似的乙烯诱导结构单元(Nicholass *et al.*, 1995)。 $LeACO1$ 基因的启动子与受乙烯调控基因的启动子区域具有很高的同源性(Pear *et al.*, 1989)。目前, 通过差势筛选技术能得到大量的在番茄果实成熟过程中特异性表达的基因(表 1-4) (Zegzouti *et al.*, 1999)。

1.3 本研究目的与研究内容

1.3.1 目的意义

基因组测序为我们提供了大量的序列信息, 建立高通量的基因功能鉴定方法显得日益重要。转基因技术是植物中常用的基因功能鉴定方法, 但该方法操作复杂, 转化效率低, 对物种具有选择性。与转基因技术相比, 病毒诱导的基因沉默技术(VIGS)具有操作简单, 周期短和沉默效率高等优点, 适合植物基因的高通量功能分析。

植物幼苗是建立 VIGS 体系的良好材料, 但苗期产生的目的基因沉默效果通常不能持续到生殖生长阶段。番茄幼苗 VIGS 体系已有报道, 但该条件下产生的目的基因沉默效果并不能持续到番茄的花和果实。有报道, 环境条件是影响 VIGS 的重要因素。通过调节植物生长的环境条件, 建立适合植物整个生长发育时期的 VIGS 体系, 有利于扩大 VIGS 的应用范围, 加快目的基因的鉴定步伐。

番茄是研究跃变型果实成熟机理的模式材料, 番茄基因组测序和 EST 文库的建立将为我们提供大量果实成熟相关基因的序列信息。直接在番茄果实中建立 VIGS 体系将有利于对番茄果实成熟相关基因进行高通量分析。

乙烯通过信号传导途径调节番茄果实的成熟过程。 $EIN2$ 是乙烯信号传导途径中的重要元件, 目前在拟南芥, 水稻和矮牵牛等植物中完成了该基因的分离和鉴定工作, 但番茄 $LeEIN2$ 基因只有部分序列被克隆, 未见有该基因功能的相关报道。利用建立的 VIGS 体系在番茄果实中研究

LeEIN2 基因的功能, 有利于确定该基因与番茄果实成熟之间的相互关系, 丰富乙烯信号传导理论; 有利于进一步验证在番茄幼苗和果实中所建立 VIGS 体系的可靠性。

1.3.2 研究内容

1.3.2.1 番茄幼苗 VIGS 体系的建立

- (1) 番茄八氢番茄红素去饱和酶基因(*PDS*)片段克隆以及病毒载体 TRV-*PDS* 构建。
- (2) 环境条件(温度, 湿度) 对番茄幼苗 VIGS 效果的影响。
- (3) *PDS* 沉默番茄叶片分析: 表型分析, 叶绿素含量分析, 八氢番茄红素 HPLC 分析, 目的基因 *PDS* 的 RT-PCR 半定量分析。
- (4) *PDS* 沉默番茄茎的表型分析。
- (5) *PDS* 基因沉默番茄花分析: 表型分析, 八氢番茄红素 HPLC 分析, 目的基因 *PDS* 的 RT-PCR 半定量分析。
- (6) *PDS* 沉默番茄果实分析: 表型分析, 八氢番茄红素和番茄红素 HPLC 分析, 目的基因 *PDS* 的 RT-PCR 半定量分析。
- (7) *PDS* 基因沉默番茄叶片, 花和果实的病毒检测分析。

1.3.2.2 番茄果实基因沉默体系的建立

1.3.2.2.1 烟草脆裂病毒直接侵染番茄果实

离体番茄果实的真空渗透, 活体番茄果实的果面, 果茎和果柄侵染, RT-PCR 检测病毒的在番茄果实是否复制和转移。

1.3.2.2.2 离体番茄果实 VIGS 体系的建立

- (1) *LeACS2* 基因片段的克隆和病毒载体 TRV-*LeACS2* 构建。
- (2) 番茄果实最佳真空渗透条件的确定。
- (3) *LeACS2* 基因沉默番茄果实分析: 表型分析, ACC 和乙烯合成量分析, *LeACS2* 基因 RT-PCR 半定量分析。

1.3.2.2.3 活体番茄果实 VIGS 体系的建立

A. 番茄果实 *LeCTR1* 基因沉默。

- (1) *LeCTR1* 基因片段的克隆和病毒载体 TRV-*LeCTR1* 的构建。
- (2) 病毒载体 TRV-*LeCTR1* 果柄和果实表面侵染效果比较。

(3) *LeCTR1* 基因沉默番茄果实分析：表型分析，*LeCTR1* 基因 RT-PCR 半定量分析。

B. 番茄果实 *LeEILs* 基因沉默。

(1) *LeEILs* 基因片段的克隆和病毒载体 TRV-*LeEILs* 构建。

(2) TRV-*LeEIL* 病毒载体番茄果柄注射侵染。

(3) *LeEILs* 基因沉默番茄果实分析：表型分析，*LeEILs* 基因 RT-PCR 半定量分析。

1.3.2.3 番茄果实 *LeEIN2* 基因功能分析

(1) 番茄 *LeEIN2* 基因片段的克隆和病毒载体 TRV-*LeEIN2* 构建。

(2) *LeEIN2* 基因的 Southern 分析。

(3) TRV-*LeEIN2* 侵染番茄幼苗及沉默果实分析：表型分析和 *LeEIN2* 基因 RT-PCR 半定量分析。

(4) TRV-*LeEIN2* 侵染番茄果实及沉默效果分析：表型分析和 *LeEIN2* 基因 RT-PCR 半定量分析。

第二章 番茄幼苗VIGS体系的建立

2.1 引言

早在 2002 年, Liu 等就利用烟草脆裂病毒载体(TRV)成功的在番茄幼苗中建立了 VIGS 体系(VIGS), 但目前该方法在番茄繁殖器官如花和果实的研究未见报道(Liu *et al.*, 2002a)。番茄是研究果实成熟的模式材料, 番茄基因组研究工作的顺利进行为我们研究番茄果实成熟机理提供良好的信息资源(Moore *et al.*, 2002; Fei *et al.*, 2004)。在番茄繁殖器官中建立 VIGS 体系能部分代替转反义基因的遗传操作, 将加快基因功能的研究步伐。本实验在 Liu 等的研究基础上, 通过优化诱导基因沉默的环境条件, 成功的在番茄的花和果实等繁殖器官中建立了 TRV 诱导的基因沉默体系。

为了在番茄植株中建立 VIGS 体系, 我们选择 TRV 载体为材料, 同时选择八氢番茄红素去饱和酶基因 (*PDS*) 为报告基因。与其它病毒载体材料相比, TRV 应用广泛, 能侵染植物组织的生长点(Ratcliff *et al.*, 2001)。*PDS* 基因是番茄红素合成途径中一个关键酶基因(Bramley 2002)。该基因编码蛋白质位于叶绿体的膜上, 对叶绿体起到一种特殊的保护作用。当叶绿体失去该酶的保护作用以后, 会在光的作用下发生氧化作用, 导致叶绿素的降解, 富含叶绿素的组织变成白色, 这种现象被称为光漂白现象(Kumagai *et al.*, 1995; Lichtenthaler, 1987)。由于 *PDS* 沉默所带来的表型容易用肉眼观察, 该基因被习惯作为在植物幼苗中建立 VIGS 体系的报告基因(Liu *et al.*, 2002a; Faivre-Rampant *et al.*, 2004)。

2.2 材料与试剂

2.2.1 植物材料

番茄 (*Lycopersicon esculentum* cvs. Lichun) 购于中国农业科学院蔬菜花卉研究, 烟草种子 NC89 本实验室保存。

2.2.2 菌株与质粒

TRV 载体 pTRV1 和 pTRV2 由耶鲁大学 S. P. Dinesh-Kumar 教授惠赠。

大肠杆菌 (*Escherichia Coli*) DH5 α 为本实验室保存菌株。

农杆菌 (*Agrobacterium Tumefaciens*) GV3101 来源于中国科学院微生物所。

2.2.3 酶及试剂

Taq DNA 聚合酶(天为时代生物有限公司)

DL2000 Marker(Takara 公司)

胶回收试剂盒(上海生工生物技术公司)

限制性内切酶 *Eco*RI、*Hind*III、*Sac*I、*Xba*I 和 *Bam*HI, T4 DNA 连接酶, pGEM-Teasy system 及 Reverse Transcription system kit 均购自 Promega 公司

PCR 引物由北京博亚生物技术公司和上海生物工程有限公司合成。

2.2.4 常用试剂配制

2.2.4.1 培养基的配制

a.LB 液体培养基: 10g 胰化蛋白胨, 5g 酵母提取物, 10g 氯化钠, 1ml 1mol/LNaOH, 用蒸馏水定容至 1L, 121℃高压灭菌 18min 备用。LB 固体培养基: 10g 胰化蛋白胨, 5g 酵母提取物, 10g 氯化钠, 1ml 1mol/LNaOH, 15g 琼脂糖, 用蒸馏水定容至 1L, 121℃高压灭菌 18min 备用。

b.YEB 液体培养基: 10g 胰化蛋白胨, 1g 酵母提取物, 10g 氯化钠, 用 NaOH 溶液调节 pH 为 7.0, 用蒸馏水定容至 1L, 121℃高压灭菌 18min 备用。

YEB 固体培养基: 10g 胰化蛋白胨, 1g 酵母提取物, 10g 氯化钠, 15g 琼脂糖, 用 NaOH 溶液调节 pH 为 7.0, 用蒸馏水定容至 1L, 121℃高压灭菌 18min 备用。

2.2.4.2 RNA 提取用试剂

- (1) 0.1%DEPC 水: 在无 RNA 酶的试剂瓶用双蒸水配制成 0.1% DEPC 水, 37℃放置 12h 以上, 121℃高压灭菌 30min。
- (2) 75%乙醇 (v/v): 用 0.1%DEPC 水和无水乙醇配制成 75%乙醇。
- (3) 异硫氰酸胍提取液: 各种成分的浓度分别为: 4mol/L 异硫氰酸胍; 25mol/L 柠檬酸三钠 (pH7.0); 1.5%十二烷基肌氨酸钠; 0.1mol/L β -巯基乙醇 (临用时加); 氯仿:异戊醇: 按 49:1 的体积比配制。

2.2.4.3 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞制备及转化用试剂

- (1) 1mol/LCaCl₂: 11.1gCaCl₂ 溶于 100ml 水中, 121℃高压灭菌 20min, 4℃保存。

- (2) 氨苄青霉素 (Amp) 贮存液 100mg/ml: 1.0g Amp 溶于 10ml 水, 过滤除菌, -20℃分装冻存。
- (3) X-Gal 贮存液, 20mg/ml: 100 mg X-Gal 溶于 5ml 二甲酰胺中, -20℃避光保存。
- (4) IPTG 溶液, 200mg/ml: 2g IPTG 溶于 10ml 灭菌双蒸水, 过滤除菌, -20℃分装冻存。
- (5) LB 液体培养基 (1L): 10g NaCl、10g 蛋白胨、5g 酵母提取物, 定容至 1 L, 调 pH7.0, 121℃高压灭菌 20min。
- (6) Amp/LB 液体培养基, Amp 终浓度 100 μ g/ml。
- (7) Amp/LB 固体培养基: 将 15 g 琼脂粉溶于 1 L LB 液体培养基中, 121℃高压灭菌 20 min, 冷却至 50℃左右, 加入 Amp 至终浓度为 100 μ g/ml, 浇制平板。
- (8) Amp / LB / X-Gal / IPTG 平板: 在制备好的 Amp/LB 平板上加入 40 μ l X-Gal 贮液和 4 μ l IPTG 溶液, 用无菌涂布器均匀涂布于平板表面, 37℃温育至完全吸收。

2.2.4.4 大肠杆菌质粒 DNA 提取用试剂

- (1) STE: NaCl 0.1mol/L; Tris.Cl(pH8.0) 0.01mol/L; EDTA(pH8.0) 1mol/L。
- (2) Solution I: 葡萄糖 0.05 mol/L; Tris.Cl(pH8.0) 0.025mol/L; EDTA(pH8.0) 0.01mol/L。
- (3) Solution II: NaOH 0.2mol/L; 1%SDS 现用现配。
- (4) SolutionIII: 5mol/L 乙酸钠 60ml; 冰乙酸 11.5ml; 双蒸水 28.5ml。
- (5) TE 缓冲液: 0.01mol/L Tris.Cl(pH8.0); 0.1mol/L EDTA(pH8.0)。
- (6) RNA 酶 A 贮存液 10mg/ml: 100mgRNaseA 溶于 10ml 含 10mM Tris.Cl(pH7.5), 15m mol/L NaCl 溶液中, 于 100℃煮沸 15min, 分装后-20℃冰箱冻存备用。

2.2.4.5 琼脂糖凝胶电泳试剂

- (1) 0.5mol/L EDTA : 18.61g Na₂EDTA·12H₂O 溶于 800ml 双蒸水, 用 1mol/L 的 NaOH 调 pH 值至 8.0, 待完全溶解后, 定容至 1L, 121℃高压灭菌 30min。
- (2) EB 贮存液 (10mg/ml): 100mg EB 溶于 10ml 双蒸水, 室温下避光保存。
- (3) 50×TAE (1L): Tris 242g、冰醋酸 57.1ml、EDTA (0.5mol/L, pH8.0) 100ml, 用蒸馏水定容为 1L。
- (4) 6×上样缓冲液: 0.25% 溴酚兰、0.25% 二甲苯青 F F、30%甘油、4℃保存。

2.2.4.6 MOPS 缓冲液的配制

- (1) 配 0.125mol/L 的 NaAC 500ml, 然后加 0.5mlDEPC, 混匀, 37℃处理 12h 后, 121℃高压

灭菌 1h。

(2) 2 mol/L NaOH: 用于调节 pH 值。

(3) 配 0.5 mol/L EDTA 母液 (pH8.0), 0.1%DEPC 处理, 121℃ 高压灭菌 1h。称 41.86g MOPS 溶于灭菌的盛有 400ml NaAC 的 500ml 容量瓶中, 使其完全溶解, 然后加入 0.5mol/L EDTA 10ml, 用 2mol/L NaOH 调节 pH 值 7.0, 用 0.1% DEPC 处理水定容, 过滤除菌, 保存于棕色试剂瓶中。

注: 配制过程中应防止 RNA 酶的污染, 所用玻璃器皿 (如烧杯、玻璃棒、容量瓶等) 均要于 200℃ 烘 4h。

2.2.4.7 变性胶的配制

称 0.5g 琼脂糖, 然后加入 40ml 灭菌的 DEPC 处理水, 用微波炉加热, 使琼脂糖完全融化均匀。待胶凉一些后依次加入 9ml 甲醛, 5ml MOPS 缓冲液 (10×), 混合均匀后灌制琼脂糖凝胶。

2.2.5 主要仪器设备

- (1) 高速台式冷冻离心机 20G: 上海安亭科学仪器厂。
- (2) PCR 仪: HYBAID LIMITED (英国)。
- (3) LRH-150B 型生化培养箱: 广东省医疗器械厂。
- (4) DYY-III31A/31B 型电泳槽、DYY-III2 型稳压稳流电泳仪: 北京六一仪器厂。
- (5) THZ-C 型空气浴恒温振荡器: 江苏太仓市实验设备厂。
- (6) WTH-201 型多功能紫外透射仪: 温州市孚华分析仪器厂。
- (7) -80℃ 超低温冰箱 REVCO (美国)。
- (8) 高压喷枪 (中国台湾), 小型压缩机 (中国温州)。
- (9) 液相色谱 (日本岛津 LC-6A)。

2.3 实验方法

2.3.1 番茄叶, 花和果实总 RNA 的提取

番茄总 RNA 的提取, 采用异硫氰酸胍法, 具体步骤如下:

- (1) 取 0.85g 新鲜的番茄样品放在研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成均匀的粉末。
- (2) 将粉末全部移入 3 个冰上预冷的 1.5ml 离心管中, 上下颠倒几次离心管混合均匀。

- (3) 每管加入 650 μ l 异硫氰酸胍溶液, 再加入 325 μ l 水饱和酚及 325 μ l 氯仿/异戊醇 (49/1)。
- (4) 上下颠倒几次, 混匀, 冰上 5 min, 12,000g 离心 10 min。
- (5) 取上清液 750 μ l, 加入水饱和酚及氯仿/异戊醇 (49/1) 各 375 μ l。
- (6) 4 $^{\circ}$ C, 12,000g 离心 10min。
- (7) 取上清液 700 μ l, 加入 700 μ l 异丙醇, 沉淀 1h (-20 $^{\circ}$ C)。
- (8) 用 1ml 75%的乙醇洗沉淀一次, 12,000g 离心 5min。
- (9) 除尽上清, 稍微晾干后, 溶于适量 DEPC 处理的灭菌蒸馏水。检测后分装, 于-80 $^{\circ}$ C低温条件下保存, 要避免对 RNA 的反复冻融。

2.3.2 番茄 *PDS* 基因的扩增

2.3.2.1 反转录 (RT)

按照 Promega 公司的 Reverse Transcription System Kit 说明进行, 建立总体积为 20 μ l 的反转录反应体系。首先在 PCR 管中加入总 RNA 2 μ l ($\leq 1\mu$ g), 25 μ mol/L oligo(dT)₁₈ 2 μ l, 70 $^{\circ}$ C 温育 10min 破坏 RNA 的二级结构, 立即冰浴 2min, 离心将管内液体收集至管底。在冰上依次加入下列试剂: 5 $\times$ RT 缓冲液 4 μ l; RNA 酶抑制剂 (20U/ μ l) 1 μ l; dNTP₅ (10mM each) 2 μ l; AMV 反转录 (15U/ μ l) 1 μ l; DEPC 处理水 8 μ l。离心混匀, 将管内液体收集至管底, 42 $^{\circ}$ C 温育 1h, 95 $^{\circ}$ C 加热 5min 灭活反转录酶, 立即冰浴 5min, 贮于-20 $^{\circ}$ C 备用。

2.3.2.2 PCR 扩增

建立 50 μ l 的 PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l; 反转录反应产物 (cDNA) 1 μ l; 上游引物 (25 μ M) 2 μ l; 下游引物 (25 μ M) 2 μ l; dNTP₅ (10mM each) 1 μ l; Taq DNA 聚合酶 (2U/ μ l) 1 μ l; 灭菌的无核酶重蒸水 38 μ l。离心混匀, 在 HYBAID PCR 仪中 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 按以下程序进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 秒, 53 $^{\circ}$ C 退火 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束反应。琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物。

2.3.2.3 序列测定及分析

序列测定由上海博亚生物技术公司和上海生物工程公司完成。利用 DNAMAN (Version 5.0) 等软件分析测序结果。

2.3.3 DNA 快速回收

- (1) 用琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其它 DNA 尽可能分开。然后用干净的手术刀切下含所要回收 DNA 的琼胶块, 放入 1.5mL 离心管中。
- (2) 每 100mg 琼脂糖凝胶中或 100 μ l 的 DNA 溶液中加入 400 μ l Binding Buffer, 置于 50-60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 使胶彻底融化。加热溶胶时, 每 2min 混匀一次。对于高浓度的胶(1.5-2%), 每 100mg 胶加入 700 μ l Binding Buffer, 溶胶时间可以延长到 15min, 凝胶完全融化。
- (3) 将融化的胶溶液转移到套放于 2mL 收集管 UNIQ-10 柱中, 室温放置 2min。8000g 室温离心 1min。适当降低离心速度有利于提高 DNA 结合率。
- (4) 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中废液, 将 UNIQ-10 柱放回收集管中, 加入 500 μ l Washing Solution, 10,000g 室温离心 30 sec。
- (5) 重复步骤 4 一次。
- (6) 取下 UNIQ-10 柱, 倒掉收集管中废液, 将 UNIQ-10 柱放回收集管中, 10,000g 室温离心 15s。
- (7) 将 UNIQ-10 柱放入一根新的洁净 1.5 mL 离心管中, 在柱膜中央加入 30 μ l Elution Buffer 或双蒸水 (pH>7.0), 室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 2 min。提高洗脱温度 (55-80 $^{\circ}$ C) 有利于提高 DNA 的洗脱效率。
- (8) 10,000g 室温离心 1 min, 离心管中的液体即为回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

2.3.4 质粒转化和提取

2.3.4.1 大肠杆菌 DH5 α 杆菌质粒的转化和提取

2.3.4.1.1 感受态细胞的制备—氯化钙法

- (1) 挑取大肠杆菌 DH5 α 单菌落接种于含 4ml LB 液体培养基的试管中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜;
- (2) 取 800 μ l 菌液于 100ml 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 2-3h, 至 OD₆₀₀ 达 0.3-0.5;
- (3) 将 40ml 细菌培养物无菌条件下转移至 50ml 预冷的离心管, 置于冰上 10min;
- (4) 4 $^{\circ}$ C, 4000g 离心 10min, 弃上清, 收集菌体沉淀;
- (5) 每管加 10ml 预冷的 100 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L Tris-Cl (pH8.0) 溶液重悬细胞, 冰 30min;
- (6) 4 $^{\circ}$ C, 4000 g 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀;
- (7) 每管沉淀用 2ml 预冷的 100 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L Tris.Cl (pH 8.0) 溶液轻轻悬浮, 置于 4 $^{\circ}$ C, 24h 内现用。或加入终浓度为 20% 的甘油, 混匀后分装 200 μ l/管, -70 $^{\circ}$ C 备用。

2.3.4.1.2 重组质粒 DNA 的转化

- (1) 开盖前将连接产物离心至管底,于冰上吸取 5 μ l 连接物加入 1.5ml 灭菌的 Eppendorf 管中。
- (2) 取出 -70℃ 冻存的 DH5 α 感受态细胞,置冰上使其缓慢融化,轻弹管壁使细胞混合均匀。
- (3) 取 100 μ l 感受态细胞置于离心管中,此时要避免过多的吸吹、移液,轻轻混匀细胞(用手轻轻弹管壁 3、4 下),立即置冰上 30 min。
- (4) 将管置 42℃ 恒温水浴中热激 90s,立即放回冰上 5min。
- (5) 加入 800 μ l 无附加抗生素的 LB 液体培养基,混匀,37℃ 预表达培养 1.5 h (150g/min)。
- (6) 吸取 200 μ l 菌液涂布于 LB/Amp/IPTG/X-Gal 平板上,37℃ 保温培养约 16~24h,观察菌落生长情况,利用蓝白斑初筛重组转化体。

2.3.4.1.3 质粒 DNA 的小量制备——碱裂解法制备

- (1) 用无菌牙签挑取白色单菌落接种于 3ml Amp/LB 液体培养基中,37℃ 摇菌 (200g/min) 过夜。
- (2) 吸取 1.5ml 菌液于 1.5ml 的 Eppendorf 管中,12,000g 离心 5 min。
- (3) 将细菌沉淀用 0.5ml STE 重悬后,12,000g 离心 5 min,倾去上清,使细菌沉淀尽量干燥。
- (4) 用 100 μ l 冰预冷的 Solution I 重悬细菌沉淀,剧烈振荡,冰浴 3~5min。
- (5) 加入 200 μ l 新配制的 Solution II,盖紧管口,快速颠倒 5 次以混合内容物,应确保整个管内表面均与 Solution II 接触,不要振荡,置于冰上 3~5min。
- (6) 加入 150 μ l 冰预冷的 Solution III,温和振荡 10 秒,冰浴 3~5min。
- (7) 4℃,12,000 g 离心 5min,吸取上清于另一个离心管中。
- (8) 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1),振荡混匀,4℃12,000g 离心 2min,将上层水相转移至另一离心管中内。
- (9) 用 2 倍体积的无水乙醇于室温下沉淀质粒 DNA 30min。
- (10) 4℃,12,000g 离心 5min,吸去上清,除尽管壁上的液滴。
- (11) 用 1ml 冰预冷的 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀,4℃,12,000g 离心 10min。
- (12) 吸尽上清,除尽管壁上的液滴,空气中晾干 10min。
- (13) 用 20 μ l 含无 DNase 的 RNase A (20 μ g/ml) 的 TE 或灭菌的双蒸水溶解质粒 DNA 沉淀,于 -20℃ 冻存备用。

2.3.4.2 农杆菌感受态的制备及转化

2.3.4.2.1 感受态的制备

- (1) 挑取农杆菌 GV3101 单菌落, 接种于 2.0ml YEB 培养基 (Gen 125mg/L) 中, 28℃振荡培养过夜。
- (2) 取 400μl 菌液置于 50ml YEB 培养液中, 28℃振荡培养 5-6h 至 OD₆₀₀ 为 0.5。
- (3) 菌液倒入 50ml 离心管中, 5000g 离心 5min 集菌, 弃上清。
- (4) 菌体悬于 10ml 0.15mol/L NaCl, 5000g 离心 5min。
- (5) 菌体用 1ml 预冷的 20mmol/L CaCl₂ 溶液轻轻悬浮, 置于 4℃冰箱中, 12-24h 内现用或 200μL 分装 (含 20%甘油), -70℃保存备用。

2.3.4.2.2 转化农杆菌

取 200μL 感受态细胞, 加入 1μg 质粒 DNA, 冰浴 30min, 之后于液氮中冻 3-5min, 37℃水浴融化 5min, 再加入 1ml YEB 培养基, 28℃振荡 4h, 10000g/min 离心 30 秒, 去上清, 加入 200μL YEB 液体培养基悬浮细胞, 涂布含有相应抗生素和硫酸庆大霉素(Gen)的 YEB 固体平板上, 28℃培养 2d 观察菌落生长情况。

2.3.5 农杆菌侵染

以温室培养的四叶期番茄和烟草幼苗为实验材料, 幼苗培养条件: 白天温度为 15℃, 夜间温度为 12℃, 相对湿度为 30%, 每天保证光照 16h。通过冻融法把载体 pTRV1, pTRV2 (pYL156), TRV-*PDS* 转入农杆菌 GV3101。用 5ml LB 培养基 (50 μg/ml Gen, 50 μg/ml Kan) 28℃震荡过夜, 再用 50ml 的 LB 培养基 (50 μg/ml Gen, 50 μg/ml Kan, 10 mM MES 和 20 mmol/l 乙酰丁香酮) 28℃培养过夜, 离心收集菌体。用侵染缓冲液(10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/L MES 和 200 mmol/l 乙酰丁香酮)悬浮菌液, 调节 OD₆₀₀ 值为 1.0~2.0, 室温静置 3h。用高压喷枪对番茄幼苗进行喷射侵染, 压缩机压力保持在 75psi (Liu *et al.*, 2002a)。观察侵染植株的表型变化, 如番茄幼苗新长出叶片是否变白。

2.3.6 番茄植株 *PDS* 基因沉默分析

2.3.6.1 病毒检测和目的基因的RT-PCR半定量分析

番茄总 RNA 提取参照 Gregory 等 (1988) 的异硫氢酸胍-酚-氯仿小量提取方法进行并略有改动。番茄第一条 cDNA 链按照 promega 反转录试剂盒操作说明进行。根据发表的 *PDS* 基因序列, 设计合成两个特异性引物:

正义引物: 5' GTC GAC GCT TTA CCC GCT CCTT 3'

反义引物: 5' ATC GAT TGC ACT ACC GTC ACTC 3'

在 50 μ l 反应体系中加 10 $\times$ PCR buffer 5 μ l, 正义引物和反义引物各 50pmol, 3UTaqDNA 聚合酶, 4 μ l dNTP(2.5mmol/L), 2 μ l MgCl₂(15mmol/L), cDNA 2 μ l。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 分别进行 18, 21, 24, 27, 30 和 35 个循环扩增, 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物在 1% 的琼脂糖电泳检测。

病毒 RT-PCR 检测引物: RNA1 引物(AF406990):

正义引物: 5' TTACA GGTTA TTTGG GCTAG 3'

反义引物 : 5' CCGGG TTCAA TTCCT TATC 3'

RNA2 引物 (AF406991):

正义引物: 5' CGG TCT AGA GGC ACT CAA CTT TAT AAA CC 3'

反义引物: 5' CGG GGA TCC CTT CAG TTT TCT GTC AAA CC 3'

病毒检测进行 35 循环扩增。

2.3.6.2 叶绿素的提取和测定

- (1) 取样, 剪碎, 混匀, 然后称取新鲜样品 0.1g。
- (2) 样品置研钵中, 加入碳酸钙和石英沙及 0.5ml 纯丙酮研成匀浆, 再加 80%丙酮 10ml 继续研磨至组织变为白色。
- (3) 取滤纸一张, 放入 80%丙酮润湿, 把提取液倒入漏斗中, 滤入 25ml 容量瓶, 用少量丙酮冲洗研钵数次, 最后连残渣一起倒入漏斗。
- (4) 用滴管吸取 80%丙酮, 一滴一滴的将纸上的叶绿素提取液全部洗入量瓶中, 直到滤纸和残渣中无绿色为止。最后用 80%丙酮定容至 50ml。
- (5) 把叶绿素提取液倒入光径 1cm 的比色杯中, 用分光光度计在波长 645, 652, 663nm 下测定光密度值, 以 80%丙酮为空白对照。
- (6) 按照下列公式计算叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量。两者相加为总叶绿素的含量, 单位为 mg/L。
$$Ca=12.7D_{663}-2.59D_{645}$$
$$Cb=22.9D_{645}-4.67D_{663}$$
- (7) 求的叶绿素的浓度后再按照下列公式计算组织中各色素的含量(用 mg/g 鲜重单位或干重表示)
$$\text{叶绿素含量}=[c(\text{mg/L})\times\text{提取液总量}(\text{ml})\times\text{稀释倍数}]/[\text{样品鲜重}(\text{mg})\times 1000]$$

2.3.6.3 番茄红素的 HPLC 分析

参照方法(Paul *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2000)。小量提取在1.5ml离心管中进行,称取1-2mg研碎的冻干组织样品,加100 μ l 色谱级100%甲醇,混匀,在4℃ 条件下放置5min。加入100 μ l 提取缓冲液Tris.Cl (50mmol/L, pH 7.5, 1mol/L NaCl), 4℃ 条件下放置10min。加入400 μ l 氯仿混匀4℃ 条件下冰上放置10min。4℃ 条件下, 3000 g 离心5min。移去水相,有机相用400 μ l 氯仿溶液重复抽提一次。大量提取称取500mg研碎的冻干组织样品,所用的提取缓冲液, 甲醇和氯仿体积分别为1.5ml, 1.5ml 和4ml。必要时添加60% w/v KOH 和甲醇至终浓度为 6%(w/v)。提取液混合在避光条件下60℃ 静止30min。把氯仿提取液转移到一新的离心管中,用液氮吹干。吹干样品在液氮条件下-20℃ 保存,分析前,样品用100%甲醇溶解,取10 μ l 上样分析。色谱条件: 色谱仪: LC-6A (岛津); 标样: 40 μ g /ml; 色谱柱: intertsil-ODS-3 5 μ m 250 $\times$ 4.6mm(日本); 流动相: 乙腈: 三氯甲烷=92:8(v/v);流速: 2ml/min; 柱温: 40℃; 检测器: SPD-6AV; 检测波长: 470nm。

2.3.6.4 八氢番茄红素的 HPLC 分析 (Holzberg *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2000)

参照方法(Holzberg *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2000)。称取 50mg 冻干番茄组织样品(叶片, 花和果实), 粉碎。加入 5ml 色谱级甲醇混匀, 在 4℃ 避光条件下抽提 1h, 中途混匀数次。4℃, 4000g 离心 5min, 上清转移到一干净离心管, 避光条件下用液氮吹干甲醇。再用 200 μ l 100%色谱级甲醇溶解, 取 10 μ l 提取液上柱检测。色谱条件: 色谱仪: LC-6A(岛津)。流动相: 乙腈: 甲醇: 异丙醇=85: 10: 5(v/v/v); 流速: 2ml/min; 柱温: 40℃; 检测波长: 285nm ;检测器: SPD-6AV; 色谱柱: Intertsil ODS-3 5 250 $\times$ 4.6 (日本)。

2.4 结果与分析

2.4.1 番茄果实 RNA 提取

分别从番茄果实成熟的六个不同时期（未熟期，绿熟期，破色期，转色期，粉红色期和红熟期）取样，采用异硫氰酸胍法少量提取总 RNA。结果如图 2-1 所示；提取的 RNA 没有降解，无 DNA 等杂质污染。该 RNA 可用于反转录合成 cDNA，为通过 RT-PCR 扩增目的基因 *PDS* 提供模板。



图 2-1 番茄果实不同成熟时期总 RNA 的提取

Fig 2-1. The extraction of the total RNA from the different ripening stage of tomato fruit

1, 未熟期; 2, 绿熟期; 3, 破色期; 4, 转色期; 5, 粉红色; 6, 红熟期

2.4.2 *PDS* 基因克隆及序列分析

根据 GenBank 发表的 *PDS* 基因序列(accession number: X59948)，设计合成一对特异性引物。为构建病毒载体的需要，在引物两端分别添加 *SacI* 和 *XbaI* 限制性酶切位点。以提取的番茄果实总 RNA 为模板反转录合成 cDNA，通过 PCR 扩增得到目的基因片段，大小为 543bp，与预期一致。回收 PCR 产物，连接到 pGEM-T-easy 载体，转化大肠杆菌，在氨苄青霉素条件下通过蓝白斑筛选转化子。转化子质粒酶切结果如图 2-3 所示。测序结果与发表的基因序列一致（图 2-4）。

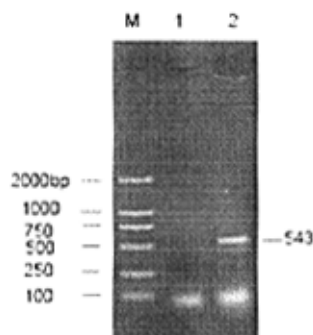


图 2-2 *PDS* 基因片段的 RT-PCR

Fig. 2-2 RT-PCR of a fragment of *PDS* gene

1, 阴性对照; 2, *PDS* 基因片段 RT-PCR; M, DL2000 分子量标准

A	TGACGGTAGTGCAATCGAGGGAGA	24
pds	AGAGTTTATACTGAGTGACGGTAGTGCAATCGAGGGAGA	40
Consensus	Tgacggtagtgcaatcgagggaga	
A	TGCTTTTGTTTGGCCGCTCCAGTGGATATTTTCAAGCTT	64
pds	TGCTTTTGTTTGGCCGCTCCAGTGGATATTTTCAAGCTT	80
Consensus	Tgcttttggtttgcecgctccagtggatattttcaagctt	
A	CTATIGCCTGAAGACTGGAAAGAGATTCCATATTTCCAAA	104
pds	CTATIGCCTGAAGACTGGAAAGAGATTCCATATTTCCAAA	120
Consensus	tattgacctgaagactggaaagagattccatattttccaaa	
A	AGTTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACA	144
pds	AGTTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACA	160
Consensus	agttggagaagttagtctggagtacctgtgataaattgtaca	
A	TATATGGTTTGACAGAAAACCTGAAGAACACATATGATCAT	184
pds	TATATGGTTTGACAGAAAACCTGAAGAACACATATGATCAT	200
Consensus	tatatggtttgacagaaaactgaagaacacatatgatcat	
A	TTGCTCTTCAGCAGAAAGCTCACTGCTCAGTGTGTATGCTG	224
pds	TTGCTCTTCAGCAGAAAGCTCACTGCTCAGTGTGTATGCTG	240
Consensus	ttgctcttcagcagaaagctcactgctcagtggtatgctg	
A	ACATGCTCTGTACATGTAAGGAATATTACAACCCCAATCA	264
pds	ACATGCTCTGTACATGTAAGGAATATTACAACCCCAATCA	280
Consensus	acatgctctgttacatgtaaggaatattacaaccccaatca	
A	GTCTATGTTGGAATTGGTTTTTGCACCTGCAGAAGAGTGG	304
pds	GTCTATGTTGGAATTGGTTTTTGCACCTGCAGAAGAGTGG	320
Consensus	gtctatgttggaaattggtttttgcacctgcagaagagtgg	
A	ATATCTCGCAGCGACTCAGAAATTATTGATGCAACGATGA	344
pds	ATATCTCGCAGCGACTCAGAAATTATTGATGCAACGATGA	360
Consensus	atatctcgcagcgactcagaaattattgatgcaacgatga	
A	AGGAACTAGCAACGCITTTTCCTGATGAAATTTCAGCAGA	384
pds	AGGAACTAGCAACGCITTTTCCTGATGAAATTTCAGCAGA	400
Consensus	aggaaactagcaacgcittttcctgatgaaatttcagcaga	
A	TCAAAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTACCATGTGTGTCAAA	424
pds	TCAAAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTACCATGTGTGTCAAA	440
Consensus	tcaaagcaaaagcaaaaattattgaagtaccatgttgtcaaa	
A	ACTCCGAGGTCTGTITATAAACTGTGCCAGGTGTGTGAAC	464
pds	ACTCCGAGGTCTGTITATAAACTGTGCCAGGTGTGTGAAC	480
Consensus	actccgaggtctgtttataaaactgtgccaggtgtgtgaac	
A	CCTGTCGGCCTTTACAAAGATCCCCAATAGAGGGGTTT	504
pds	CCTGTCGGCCTTTACAAAGATCCCCAATAGAGGGGTTT	519
Consensus	cctgtcggcctttacaaagatcccc aatagaggggtttt	
A	ATTAGCCGGTGACTACACGAAACAGAAAT.....	534
pds	ATTAGCCGGTGACTACACGAAACAGAAATACTTGGCTTC	559
Consensus	atttagccggtgactacacgaaacagaaat	
A		
pds	AATGGAAGGCGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTG	534
Consensus		592

图 2-3 *PDS* 基因片段测序结果同源性比较Fig. 2-3 Alignment of *PDS* gene fragment from tomato with *PDS* gene

扩增的目的基因片段与发表的基因序列同源在 99% 以上，可以用于构建病毒载体。

2. 4. 3 病毒载体 *TRV-PDS* 构建

烟草脆列病毒(*TRV*)是 RNA 病毒, 由 RNA1 和 RNA2 两条链组成。改造的病毒载体材料包括 p*TRV1* 和 p*TRV2* 两个独立的质粒结构, 分别装载 RNA1 和 RNA2 的遗传信息。目的基因构建在 p*TRV2* 的多克隆位点, p*TRV1* 主要负责病毒在植物组织中的转运, 构建好的病毒载体导入农杆菌用于番茄 VIGS 体系的建立。*TRV* 载体结构如图 2-5 所示。

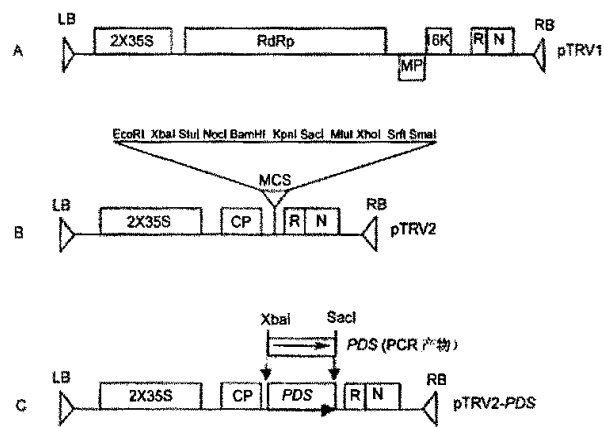


图 2-4 *TRV-PDS* 病毒载体结构

Fig. 2-4 Construction of *TRV-PDS* virus vector

A, p*TRV1* 结构; B, p*TRV2* 结构; C, *TRV-PDS* 结构

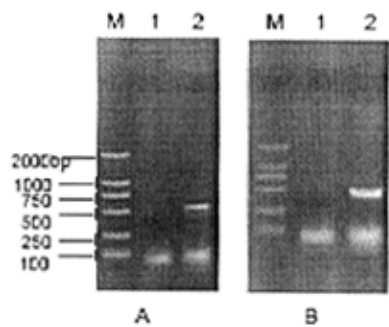


图 2-5 病毒载体 *TRV-PDS* 的构建和鉴定

Fig. 2-5 Construction and identification of *TRV-PDS* virus vector

A, 大肠杆菌质粒 *TRV-PDS* 的 PCR 检测; B, 农杆菌质粒 *TRV-PDS* 的 PCR 检测

M, DL2000 分子量标准; 1, 阴性对照; 2, 质粒 *TRV-PDS* 的 PCR

用 *Xba*I 和 *Sac*I 限制性内切酶酶切 pGEM-T-easy-*PDS* 载体, 回收目的基因片段。同时用这两种限制性内切酶酶切病毒载体 pTRV2, 回收大片段。回收的片段连接转化大肠杆菌, 在含有卡那霉素 (Kan) 的抗性条件下筛选转化子, 提取转化子大肠杆菌质粒。质粒 PCR 结果如图 2-6 所示得到相应的目的基因片段, 说明我们成功的构建了病毒载体。病毒载体 TRV-*PDS* 通过冻融法转入农杆菌 GV3101, 在 kan 和 Gen 条件下筛选转化子。目的基因 *PDS* 农杆菌菌液 PCR 鉴定结果如图 2-6 所示。说明我们获得了病毒载体材料 TRV-*PDS*。

2.4.4 侵染方法的建立

PDS 基因在各个物种之间具有很高的保守性, Liu 等曾用来源于番茄的 *PDS* 基因构建的烟草脆裂病毒载体(TRV-*PDS*)成功诱导了烟草 *PDS* 基因沉默(Liu *et al.*, 2002a)。为了摸索建立番茄中的 VIGS 体系。我们首先选择烟草和番茄幼苗为植物材料, 选择来源于番茄的 *PDS* 基因为报告基因。结合相关报道, 我们选择 1 个月左右苗龄的烟草和番茄幼苗为实验材料。实验中我们采用注射器注射和高压喷枪两种方法来探讨病毒侵染的有效方法, 操作如图 2-7 所示。实验中发现, 在番茄和烟草最适合生长条件下, 采用注射器注射, 两者均在侵染后 10d 左右出现 *PDS* 基因沉默所引起的光漂白表型, 结果如图 2-7, 8 所示。烟草的沉默效率超过 90%, 但番茄的沉默效率只有 10%。采用高压喷枪的侵染表明, 烟草的沉默效率没有明显上升, 但番茄幼苗的沉默效率超过 90%。通过比较, 我们认为高压喷枪喷洒是番茄幼苗侵染的有效方法。

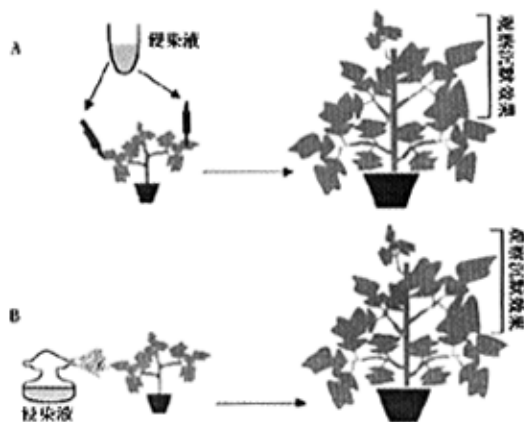


图 2-6 病毒诱导基因沉默的侵染方法示意图

Fig. 2-6 Method of inoculation of virus-induced gene silencing

A, 注射器注射侵染; B, 高压喷枪喷射侵染

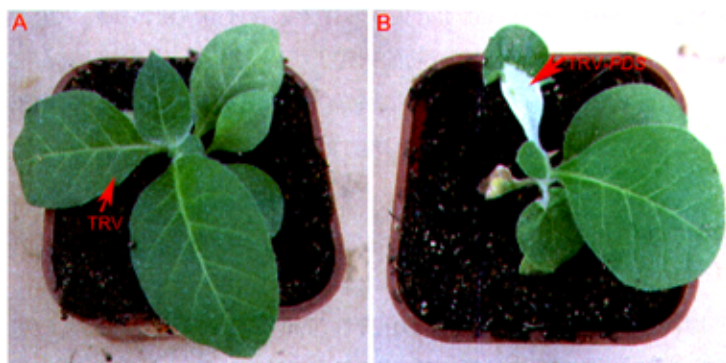


图 2-7 烟草幼苗 *PDS* 基因沉默

Fig. 2-7 Silencing of the *PDS* gene of tobacco seedling

A, 对照; B, *PDS* 基因沉默烟草表型



图 2-8 番茄幼苗 *PDS* 基因沉默

Fig. 2-8 Silencing of the *PDS* gene of tomato seedling

A, 对照; B, *PDS* 基因沉默番茄幼苗表型

2.4.5 番茄幼苗 VIGS 体系优化

在最适生长条件下，番茄幼苗在 10d 左右就出现目的基因的 *PDS* 沉默所表现的光漂白现象，该方法适合于以番茄幼苗为材料的研究，例如抗病信号传导。由于番茄植株的营养生长时期一般要持续 2-3 个月，所以该条件下产生的基因沉默很难持续到生殖生长阶段。因为 VIGS 不能遗传，而且伴随着植物的生长发育，沉默信号会消失，目的基因的沉默会慢慢恢复。在番茄最适生长条件下，侵染后 10d 出现的目的基因沉默表型只能持续 1 个月左右 (Liu *et al.*, 2002a)，该方法不适合研究番茄繁殖器官中的相关基因功能，例如花的发育和果实成熟。

为了建立适合番茄繁殖器官的 VIGS 体系，实验中我们探讨了环境条件对番茄幼苗基因沉默的影响。侵染的番茄幼苗被放置在逆境条件下生长，如低温，干旱，缺肥等条件。实验中发现，当幼苗在 15℃ 低温条件，相对湿度 30% 的干旱条件下其生长受到严重影响，株高与最适条件下的幼苗差异显著。与正常生长条件下生长的番茄幼苗相比，我们发现逆境条件下生长的番茄植株在侵染后 50-60d 才开始出现 *PDS* 沉默所引起的光漂白现象。更加有趣的是，虽然逆境影响了番茄植株的生长，但并没有影响其生殖生长出现的时间。当该植株出现基因沉默表型后不久就开始开花结果，这时我们再给予其合适的生长条件，在很短的时间里番茄植株就恢复了正常生长。另外，我们的结果还显示逆境条件下生长的植株其基因沉默表型持续的时间更长，通常能达到 4 个月以上，这将影响到植株的所有繁殖器官，包括花和果实的发育 (表一)。我们认为在逆境条件下建立的番茄 VIGS 体系可以用来进行与番茄繁殖器官发育相关基因的功能研究。

表一： 温度和湿度对番茄幼苗 *PDS* 基因沉默的影响

Table 1 Effect of temperature and humidity on silencing of *PDS* by TRV vectors

参数		沉默效率 (%)											
侵染后放置时间 (星期)		1	2	3	4	6	8	10	14	16	18	20	22
环境条件													
温度	相对湿度												
21 °C,	60%	5	50	96	80	33	0	0	0	0	0	0	0
21 °C,	30%	0	35	78	89	45	20	0	0	0	0	0	0
15 °C,	60%	0	0	40	75	95	90	78	60	30	0	0	0
15 °C,	30%	0	0	0	0	0	30	83	95	93	85	71	50

2.4.6 叶片基因沉默分析

根据上述确定的番茄幼苗 VIGS 体系。采用不同浓度的农杆菌侵染液对四叶期番茄幼苗进行高压喷枪侵染。我们发现侵染液浓度在 OD₆₀₀=1.0-2.0 之间均能获得 90% 以上的沉默效率。实验中用不含目的基因的空载体侵染作为对照。番茄幼苗被侵染后，放置在 15℃，相对湿度 30% 的条

件下生长, 观察其表型变化。大约在侵染后 50d 左右, TRV-*PDS* 侵染的番茄幼苗叶片出现光漂白现象, 对照叶片仍保持绿色(图 2-9 A, B)。*PDS* 沉默植株新长出的叶片保持绿色, 大约在 1 个星期后开始慢慢变白, 叶脉部位早于其它部位, 症状更加明显。实验中我们还发现, *PDS* 沉默植株并不是所有的叶片都变白。有的叶片 100% 变白, 有的则不那么明显。番茄植株所出现的叶片光漂白表型能持续 4 个月以上, 叶片的光漂白表型不会随着植物的生长而恢复(图 2-9 C, D)



图 2-9 番茄叶片 *PDS* 基因沉默表型

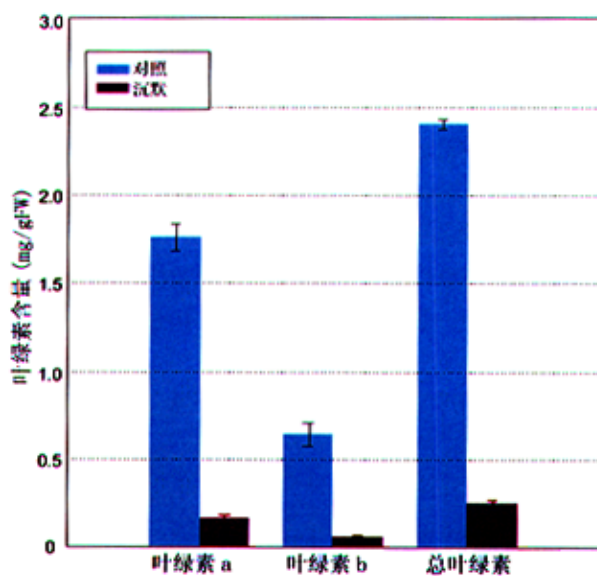
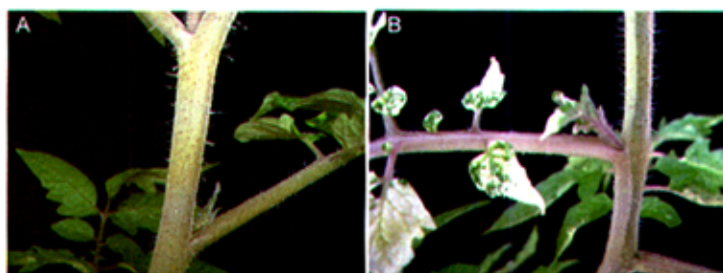
Fig. 2-9 Silencing of the *PDS* gene of tomato leaf

A, 对照; B, *PDS* 基因沉默表型(1 个月);

C, *PDS* 基因沉默表型(2 个月); D, *PDS* 基因沉默表型(4 个月)

PDS 沉默植株叶片的光漂白表型由叶绿素的降解而致(Kumagai *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002a)。为了从侧面证明番茄叶片中的 *PDS* 基因发生沉默现象, 我们分别从对照植株的绿色叶片和沉默植株的白色叶片中提取叶绿素, 采用分光光度法分析样品中的叶绿素含量。结果发现, 与对照叶片相比, *PDS* 基因沉默番茄植株的白色叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量均减少了 90% 以上(图 2-10)。

同时, 我们发现目的基因沉默的植株的茎也出现光漂白表型。与对照相比, 沉默植株的茎先变成紫红色, 然后部分变白, 但对照植株的茎始终保持绿色(图 2-11)。沉默植株叶脉和茎的表型说明沉默信号能沿着植物本身的运输通道从位于植株下面的侵染部位运送到上部的非侵染部位。在逆境条件下生长的沉默番茄植株在出现明显的基因沉默表型以后被放置在正常的生长条件下, 我们发现沉默植株恢复正常生长, 其生殖生长过程并没有因为前期的逆境条件而受到影响。大约在出现沉默表型后两个月左右, 沉默信号的强度能达到最大, 随着植物的进一步生长, 沉默信号慢慢减弱, 整个过程可以维持在 4 个月以上(图 2-9 C, D)。

图 2-10 *PDS* 基因沉默和对照番茄叶片叶绿素的含量分析Fig. 2-11 Quantification of chlorophyll decrease in leaves of tomato plant inoculated with TRV-*PDS*图 2-11 番茄植株茎的 *PDS* 基因沉默表型Fig. 2-11 Silencing of *PDS* of tomato stemA, 对照; B, *PDS* 沉默表型

2.4.7 花基因沉默分析

由于逆境并没有推迟番茄幼苗生殖生长出现的时间,番茄幼苗在出现叶片的沉默表型两个星期后,进入生殖生长时期。我们发现对照植株和沉默植株都能正常开花,这说明 *PDS* 基因沉默并没有影响番茄花的发育。有趣的是我们发现 *PDS* 沉默植株的花变成白色,而对照番茄植株的花保持原有的黄色(图 2-12)。沉默植株花的颜色变化与 *PDS* 沉默有关,因为该基因是番茄红素合成途径中的一个关键酶基因,该基因的沉默将严重影响番茄红素的合成,从而影响胡萝卜类色素的合成。另外,这可能与花中少量叶绿素的降解有关。沉默植株的花的表型表明 *PDS* 基因的沉默信号成功的由番茄营养器官(叶)转运到繁殖器官,成功的从番茄的营养生长延伸到生殖生长阶段。

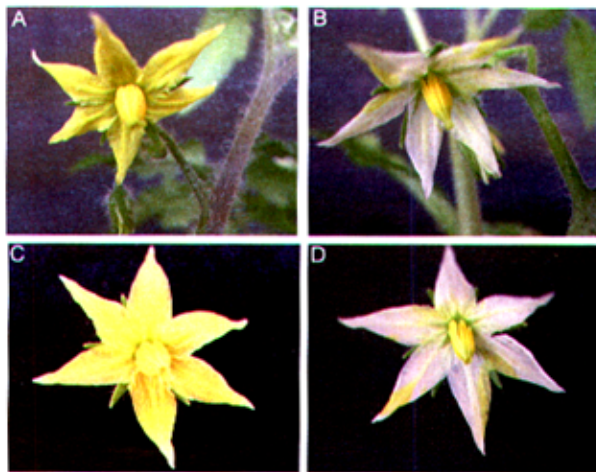


图 2-12 番茄 *PDS* 基因沉默花的表型

Fig. 2-12 Silencing of the *PDS* gene in the flower of tomato plant

A, C: 对照番茄花的表型; B, D: *PDS* 基因沉默番茄花的表型

2.4.8 果实基因沉默分析

实验中我们发现, *PDS* 基因沉默番茄果实与对照有所不同。当番茄果实处于未熟期和绿熟期发育阶段, *PDS* 基因沉默番茄果实表面呈现白色,而对照果实的表面为正常绿色。有趣的是 *PDS* 的果实表型不均匀:有些果实几乎整个表面都变成白色,而有些沉默果实的白色表面则占的比例较小;有的果实整个果实的一半都是白色,白色部分比较连续,有些果实的白色表面不连续,白色部分中夹带着绿色。尽管沉默果实的白色表型不尽相同,但我们发现,所有的沉默果实的果实绿色表面部分和白色表面具有明显的分界线,两者之间不存在过渡颜色(图 2-13 A, D, G, H)。切

开绿熟期的对照和沉默果实，两者的果肉均为绿色。白色表面的沉默果实果肉也呈现绿色。绿熟期番茄果实与花相比，有较高的叶绿素含量。当 *PDS* 基因沉默以后，在光的作用下，叶绿素发生降解出现光漂白现象，所以绿熟期沉默番茄果实会出现白色表面。但由于番茄的果肉组织没有光的作用，所以其叶绿素含量不受影响，果肉仍然保持绿色，这些结果与预期结果一致。随着番茄果实的进一步发育，我们发现 *PDS* 沉默果实和对照果实出现不同的表型变化。对照果实在成熟过程中果实表面和果肉逐渐由绿变红，这主要是果实中大量番茄红素合成和积累的结果（图 2-13 B）。而对于 *PDS* 基因沉默的番茄果实，伴随着果实的成熟过程，表面颜色变化与对照果实有明显差异。与对照果实相比，沉默果实变成浅黄色（图 2-13 E, K）。切开红熟期的沉默番茄果实，我们发现果肉呈现明显的黄色，同一时期的对照番茄果实果肉则呈现红色（图 2-13 C, F）。另外，尽管沉默番茄果实在绿熟阶段具有白色表面和绿色表面。随着沉默果实的成熟，其绿色表面并不象对照果实的绿色表面正常变红，而是保持浅黄色。

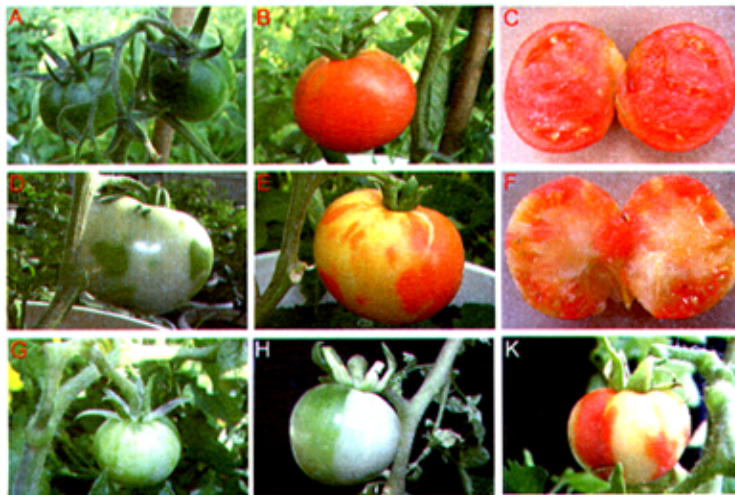


图 2-13 *PDS* 沉默番茄果实表型分析

Fig. 2-13 Silencing of the *PDS* gene in tomato fruit

- A, 对照绿熟期番茄果实； B, 红熟期对照番茄果实； C, 切开的对照红熟期番茄果实表型；
D, *PDS* 沉默绿熟期番茄果实； E, 红熟期 *PDS* 沉默番茄果实； F, 切开的 *PDS* 沉默红熟期番茄果实表型
G, H, *PDS* 沉默绿熟期番茄果实； K, 红熟期 *PDS* 沉默番茄果实

PDS 基因是番茄红素合成途径中的一个关键酶基因，该基因的沉默能有效的抑制番茄红素的合成（Liu *et al.*, 2002a）。番茄果实成熟过程中番茄红素不断积累，从而使得番茄果实的表面和果肉呈现红色（Fraser *et al.*, 1994）。从表型上我们观察到 TRV-*PDS* 诱导的 *PDS* 基因沉默的番茄果实在成熟过程中不能呈现与对照果实一样的红色，其果实表面和果肉均呈现浅黄色。为了证明这些

果实表型是由于番茄红素合成受阻所引起，我们分别从破色期和红熟期的对照和沉默果实取样，提取番茄红素进行高效液相色谱分析(HPLC)。番茄红素在番茄果实发育的破色期和红熟期大量合成(Fraser *et al.*, 1994)。番茄红素标准品的出峰时间为 10min(图 2-14 A i)。对照番茄植株的叶片中几乎检测不到番茄红素，说明番茄叶片番茄红素合成量少，所以本实验不做比较(图 2-14 A iv)。从图中我们可以发现，番茄红素在对照果实破色期和红熟期大量合成，而 *PDS* 基因沉默番茄果实番茄红素合成被显著抑制(图 2-14 A)。与同一时期的对照果实相比，沉默果实的番茄红素合成被抑制了 98% (图 2-14 B)。这些数据结果与我们观察到的果实表型变化一致,表明番茄苗期产生的 *PDS* 基因沉默信号能有效的延迟到番茄果实的生长发育阶段。

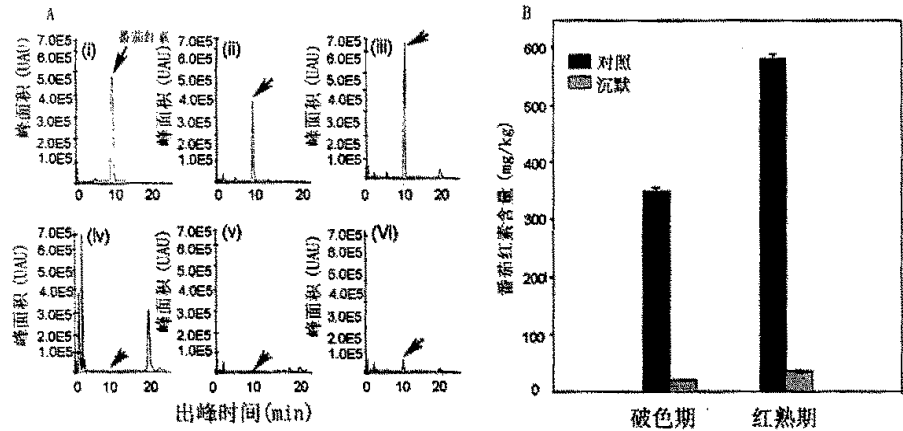


图 2-14 番茄果实番茄红素 HPLC 分析

Fig. 2-14 HPLC analysis of lycopene in tomato fruit

A I. 番茄红素标准品分析: ii, 破色期对照番茄果实; iii, 红熟期对照番茄果实; iv, 对照番茄叶片;
V, 破色期 *PDS* 基因沉默番茄果实; vi, 红熟期 *PDS* 基因沉默番茄果实;
B, *PDS* 沉默和对照番茄果实番茄红素 HPLC 定量分析

2.4.9 八氢番茄红素分析

PDS 基因沉默阻止八氢番茄红素的去饱和作用，这将导致直接前体八氢番茄红素的积累 (Faivre-Rampant *et al.*, 2004)。为了进一步的证明 TRV 诱导了番茄各个组织的目的基因 *PDS* 的沉默。我们分别从对照植株和沉默植株的叶片，花和果实中提取八氢番茄红素进行 HPLC 分析。由于世界上目前还没有八氢番茄红素的标准样品，根据相关文献我们通过抑制剂 (*Norflurazon*) 处理找到八氢番茄红素的出峰时间。该抑制剂能有效抑制八氢番茄红素去饱和酶的活性，从而导致八氢番茄红素的积累 (Faivre-Rampant *et al.*, 2004)。通过比较抑制剂处理的叶片和对照叶片的峰型变化特征，我们发现八氢番茄红素的出峰时间在 37min 左右。处理叶片中的八氢番茄红素大量积

累，并且存在顺式和反式两种结构，而在对照叶片中几乎检测不到八氢番茄红素(图 2-15 A i,ii)。从结果中我们发现，沉默番茄的叶，花和果实中的八氢番茄红素比对照植株相应组织中的八氢番茄红素明显升高(图 2-15 A)。另外，对照番茄的叶片和花中八氢番茄红素的生成量低，存在正反两种结构。但在对照果实中的八氢番茄红素只有一种结构，而且合成量较高，这是因为番茄果实成熟过程中的番茄红素合成明显上升所致(图 2-15 A vii, viii)。番茄各个组织的八氢番茄红素的 HPLC 分析结果表明，*PDS* 基因沉默导致了八氢番茄红素的有效积累，从而更进一步证明了番茄叶片，花和果实中的目的基因 *PDS* 的基因沉默。

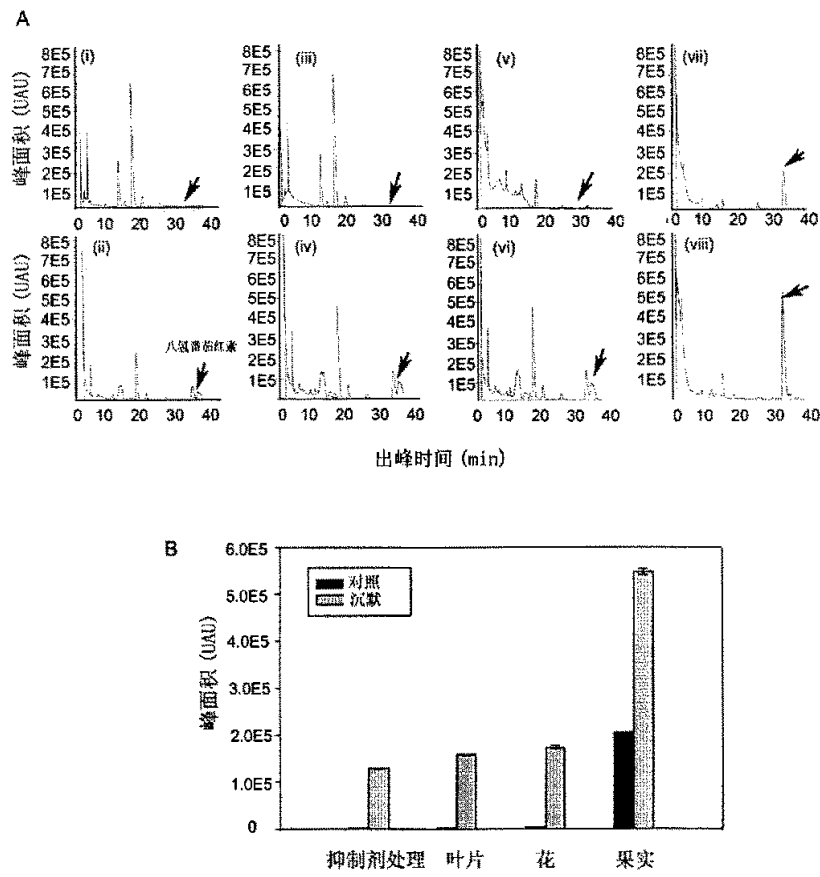


图 2-15 对照和 *PDS* 基因沉默番茄叶片，花和果实中八氢番茄红素的高效液相色谱分析

Fig. 2-15 HPLC analysis of phytoene in leaf, flower and fruit of *PDS*-silenced and control tomato plant

Ai, 对照番茄叶片; Aii, 抑制剂处理番茄叶片; Aiii, 对照番茄叶片; Aiv, *PDS* 基因沉默番茄叶片;
Av, 对照番茄花; Avi, *PDS* 基因沉默番茄花; Avii, 对照番茄果实; Aviii, *PDS* 基因沉默番茄果实;
B, 对照和 *PDS* 基因沉默番茄叶片，花和果实中八氢番茄红素的高效液相色谱分析

2.4.10 *PDS* 基因半定量 RT-PCR

VIGS 发生在 RNA 水平，目的基因 mRNA 发生显著性降解(Baulcombe, 1999, 2004)。为了在分子水平检测番茄植株各个组织的 *PDS* 基因沉默，我们对目的基因 *PDS* 进行 RT-PCR 半定量检测。分别从对照和沉默番茄植株的叶片，花和果实提取总的 RNA，通过分光光度法对 RNA 进行定量，反转录合成第一链 cDNA。以合成的 cDNA 为模板对目的基因进行 RT-PCR 扩增。在病毒载体中目的基因片段的外围合成一对特异性引物。同时以 *Ubi3* 基因(accession number: X58253)作为半定量的内参基因，该基因在番茄生长发育过程中组成型表达。从结果我们可以发现，与对照番茄植株相比，*PDS* 沉默的番茄植株的叶片，花和果实中的 mRNA 均被显著降解(图 2-16)。RT-PCR 半定量检测结果显示病毒载体 TRV-*PDS* 诱导了番茄植株的各个组织目的基因 *PDS* 基因沉默，这进一步说明在逆境条件下产生的番茄幼苗基因沉默能有效延续到生殖生长阶段。

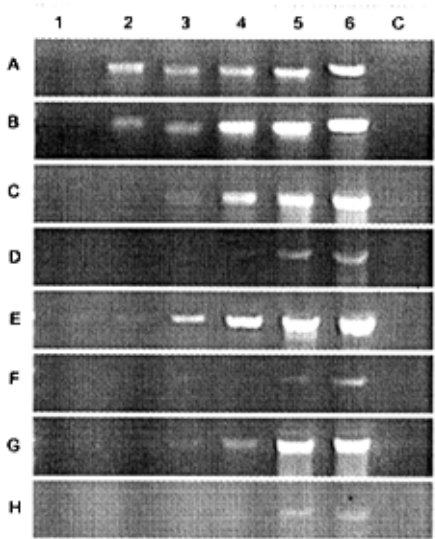


图 2-16 病毒诱导 *PDS* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 2-16 RT-PCR analysis of the *PDS* gene in the leaf, flower and fruit of the *PDS*-silenced tomato plant

- | | |
|--|---|
| A, 对照样品的 <i>Ubi3</i> 内参照基因的 RT-PCR 分析; | B, 基因沉默样品 <i>Ubi3</i> 内参照基因的 RT-PCR 分析; |
| C, 对照叶片 <i>PDS</i> 目的基因的 RT-PCR 分析; | D, 基因沉默叶片 <i>PDS</i> 基因的 RT-PCR 分析; |
| E, 对照花 <i>PDS</i> 目的基因的 RT-PCR 分析; | F, 基因沉默 <i>PDS</i> 基因的 RT-PCR 分析; |
| G, 对照果实 <i>PDS</i> 目的基因的 RT-PCR 分析; | H, 基因沉默果实 <i>PDS</i> 基因的 RT-PCR 分析 |

1-6 分别为 18, 21, 24, 27, 30 和 35 PCR 循环次数 C: 为阴性对照

2.4.11 病毒的分子检测

TRV 由两条 RNA 链组成, 分别为 RNA1 和 RNA2(MacFarlane 1999)。为了检测沉默植株各个组织中的病毒运动情况。我们分别以对照和沉默番茄植株的叶, 花和果实为原料提取总 RNA。考虑到病毒 RNA 不存在 polyA, 我们采用随机引物的方法合成番茄的第一链 cDNA。合成 RNA1 和 RNA2 的两对特异性引物。以合成的 cDNA 为模板进行病毒的 PCR 扩增。结果表明, 在 *PDS* 沉默植株的叶片, 花和果实中均检测到病毒 RNA1 和 RNA2 的特异性条带, 对照样品没有该特异性条带(图 2-17)。说明 TRV 能在番茄植株中复制并转移。

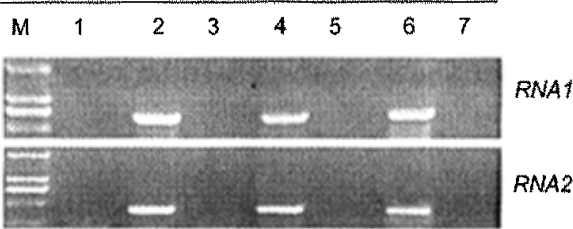


图 2-17 番茄植株叶片, 花和果实中烟草脆列病毒 RNA1 和 RNA2 的检测

Fig. 2-17 the detection of RNA1 and RNA2 in the leaf, flower and fruit of control and *PDS*-silenced tomato plant

1, 对照番茄叶片; 2, *PDS* 基因沉默番茄叶片; 3, 对照番茄花;
4, *PDS* 基因沉默番茄花; 5, 对照番茄果实; 6, *PDS* 基因沉默果实;
7, 阴性对照; M, DL2000 分子量标准

2.5 讨论

2.5.1 VIGS 与反义转基因技术之比较

随着分子生物学技术的快速发展, 获得基因序列信息将变的越来越简单(Aharoni *et al.*, 2002; Alkharouf *et al.*, 2004)。目前, 在多种生物体中完成了基因组的测序工作, 如人的染色体和拟南芥基因组等。另外, 番茄的基因组测序也正在进行中(Moore *et al.*, 2002; Richmond *et al.*, 2000)。差异筛选和基因芯片技术能方便我们获得在植物特定时期和部位表达的基因信息(Zegzouti *et al.*, 1999)。序列信息的获得只是了解新基因的第一步, 更重要的是完成该基因的功能鉴定。为了满足基因序列不断增加的趋势, 生物科学家希望找到一种高通量基因功能分析方法。转基因和突变技术是在植物中进行基因功能鉴定的传统方法, 他们对于推动植物基因的功能鉴定做出了巨大的贡

献(Gray *et al.*, 1992; Hamilton *et al.*, 1990, 1995)。但这些传统技术在运用中也存在一些不足,如筛选突变体工作量大,操作危险,工作进展缓慢(Herrera-Estrella *et al.*, 2005)。反义转基因技术通过转入含有反义目的基因的基因结构,获得在 DNA 水平上目的基因改变的转基因植株,通过转基因植株和正常植株的表型变化和其它一些生理和分子水平的分析来确定待研究目的基因的功能(Hedden and Phillips 2000; Stearns *et al.*, 2003)。转基因技术存在以下不足之处: 1, 转基因操作复杂。成功完成一项植物转基因操作,我们需要进行无菌苗培养,农杆菌侵染,愈伤组织形成,长芽和生根,转基因植株的移栽和大田管理。任何一步出现问题均会导致整个转基因过程的失败。2, 转基因操作时间较长,得到理想的番茄转基因植株一般需要两到三年的时间,这严重影响了基因功能鉴定的研究步伐。3, 目的基因的遗传转化具有选择性。那些对于植物的胚胎发育有重要作用的基因不能通过转反义基因的方法来研究,因为该基因的抑制对转基因植株具有致死效应。4, 目前的转基因操作主要集中于双子叶植物,单子叶的植物转化困难,转化效率低。5, 转基因植株的目的基因效率不稳定,有时效率很低。尽管最近发展起来的转双链发夹结构的转基因操作能提高植物目的基因的转化效率,但这还要依赖转基因操作。6, 转基因植株的鉴定工作量大,有时要植物繁殖几代才能得到一些遗传稳定的转基因植株。7, 转基因操作费用较高。

植物中 VIGS 技术是近 10 年来发展起来的快速鉴定植物基因功能的方法(Robertson, 2004; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003; Burch-Smith *et al.*, 2004)。首先构建含有目的基因片段的病毒载体,然后把病毒载体转化到农杆菌。用含有病毒载体的农杆菌去侵染正常生长的植物幼苗。当农杆菌侵染植物组织后,构建在病毒载体上的目的基因在病毒载体的作用下转录生成双链的 RNA 结构。双链 RNA 结构参与植物体内的转录后基因沉默机制。首先双链结构被植物被一种 Dicer 酶剪切形成 21-25nt 的小的双链 RNA,这种小的分子结构在植物形成 RNA 诱导的基因沉默复合体。该复合体能特异性的把植物体内转录形成的目的基因 mRNA 剪切成很小的片段,从而导致目的基因在 RNA 水平的沉默(Benedito *et al.*, 2004; Baulcombe, 2004)。VIGS 发生在 RNA 水平,不改变植物本身的 DNA。VIGS 的效果不能象转基因操作那样遗传给下一代植物植株。但目前也有报道,VIGS 可能会导致植物体内的目的基因在启动子区域发生甲基化,从而导致植物体内目的基因发生 DNA 水平的沉默,这种现象可以遗传,但具体结果有待进一步研究。与传统的转基因技术相比,VIGS 技术具有以下优点: 1, 操作简单。构建病毒载体时,目的基因的大小和在病毒载体中的方向对沉默效果没有影响。整个过程无需无菌操作,只需正常生长的植物幼苗。避免了烦琐的遗传转化过程。2, 整个过程所需时间短。从克隆目的基因片段到构建病毒载体,从农杆菌侵染植物植株到完成植物的表型分析只需要 1-2 个月,大大节省了实验的时间。3, VIGS 对目的基因的抑制效率较高,能达到 90%以上。4, 病毒载体来源广泛。目前, RNA 和 DNA 病毒均被成功的改造为可以运用 VIGS 病毒载体。5, 对单子叶和双子叶植物均可应用。TRV 可以运用于双子叶植物(Dinesh-Kumar *et al.*, 2003),大麦条纹花叶病毒能运用于大麦,水稻等单子叶植物(Holzberg *et al.*, 2002)。6, 不会出现植物的致死效应,因为在侵染植物幼苗时,植物幼苗已经完成了胚胎发育阶段。

尽管目前改造了多种病毒载体,这些病毒载体在植物中也得到了很好的应用。但目前植物中诱导的基因沉默主要有以下三个发展方向:1,改造可运用的新的病毒载体。2,在植物的不同组织中建立 VIGS 体系。3,运用病毒载体来研究植物生长发育中的理论问题。目前在很多植物中均成功建立了 VIGS 体系,但主要集中用植物的幼苗作为研究材料,这主要由于在幼苗中建立该体系比较容易。目前的理论研究主要集中用该技术研究植物抗病的信号传导途径的相关基因功能分析。我们试图在植物的整个发育过程中建立 VIGS 体系,这将扩大该技术的研究领域,可以为研究植物的繁殖器官的生长发育提供快速和高通量的基因功能鉴定方法。所以该方法的建立将有利于加速植物基因功能的研究进程。

2.5.2 TRV 诱导番茄植株的基因沉默

番茄是除拟南芥和烟草之外的一种研究植物生长发育的模式材料,尤其是研究果实的成熟机理具有更广泛的应用前景。番茄基因组测序工作的顺利进行和番茄果实 EST 库的建立为我们研究番茄果实的成熟机理提供了大量的数据信息。所以番茄是研究植物生长发育的良好材料。

早在 2002 年,耶鲁大学就在番茄的幼苗中建立了 TRV 诱导的基因沉默体系(Liu *et al.*, 2002a)。当时他们运用 *PDS* 基因作为建立该体系的报告基因,他们的研究结果发现,四星期苗龄的番茄幼苗被含有报告基因 *PDS* 的 TRV 侵染后 10d 左右出现光漂白现象,这种现象能持续 1 个月左右。我们知道番茄幼苗在经过 2-3 个月的营养生长后才能进入生殖生长阶段。所以上述条件下产生的基因沉默不能维持到番茄的花和果实等繁殖器官,该方法在研究上存在一定的局限性。同时,他们报道了番茄乙烯信号传导途径中的一个信号组件 *LeCTR1* 研究,结果证明该方法可以运用于乙烯信号传导的研究。乙烯通过信号传导途径对番茄果实的成熟过程起到重要的调控作用(Stearns and Glick 2003; Alexander *et al.* 2002a, 2002b)。所以在番茄的花和果实等繁殖器官中建立 VIGS 体系将有利于番茄果实成熟生物学的研究。

实验中我们发现低温 15℃和相对湿度 30%的逆境条件能有效延迟 TRV 诱导番茄幼苗的基因沉默(表一)。与正常生长条件下的番茄幼苗相比,逆境条件下生长的番茄幼苗在被侵染后 2 个月左右出现 *PDS* 沉默所引起的光漂白现象,但番茄生殖生长出现的时间并没有因此而影响。随着番茄植株的生长发育,叶片,花和果实均出现 *PDS* 基因沉默表型。叶子变白,花变白,果实在绿熟时期也出现白色表型。随着果实的成熟过程,我们发现对照果实表面和果肉正常变成红色,而沉默果实的表面和果肉呈现浅黄色表型(图 2-13)。果实的番茄红素 HPLC 分析表明,沉默果实的番茄红素被显著抑制,这些数据结果与观察到的表型一致(图 2-14)。叶绿素的分析表明, *PDS* 基因沉默叶片与对照相比降解了 90%。与对照番茄植株相比,沉默植株的叶片,花和果实等器官的八氢番茄红素的含量显著升高。另外,各个器官的病毒检测以及目的基因的 RT-PCR 检测均说明 TRV 诱导了番茄整个生长发育时期的 *PDS* 基因沉默(图 2-16)。综上所述,我们成功的在番茄植株中建立了 TRV 诱导的基因沉默体系,基因沉默信号能贯穿植物的整个生长发育阶段。VIGS 一

定程度上可以代替转反义基因的方法来研究番茄基因的功能。

在建立 TRV 诱导番茄基因沉默的过程中,我们还发现一些有趣的现象有待进一步的研究。列如,同一番茄植株各个叶片,各个花朵和各个果实之间的基因沉默强度不均匀。有些花会全部变白,有些不受影响。对于果实而言,在绿熟时期出现同一个果子绿色表面和白色表面同时存在的现象,而且两者之间的界限明显。但随着果实的成熟,绿色表面也不能呈现象对照果实一样的红色,但他与白色表面之间的颜色在成熟过程中的表现不一致。这说明,虽然沉默果实的表面具有两种表型,但也许整个果实都发生了目的基因的沉默,只是沉默的程度不同而已。但为什么同一个果实的不同部位沉默信号强度不同,是什么原因导致了这种现象的出现,结果有待进一步研究。虽然我们在叶,茎,花和果实等器官都观察到了相应的目的基因沉默表型,但是基因沉默信号的物质基础目前尚不清楚。来源于番茄的 *PDS* 成功的沉默了烟草中的目的基因,引起了烟草叶片出现光漂白现象。这说明 *PDS* 在烟草和番茄有很高的同源性。实验中我们还发现高压喷枪喷洒是病毒侵染番茄幼苗的良好方法,能得到 90%以上的侵染效率。

第三章 番茄果实VIGS体系的建立

3.1 前言

果实是植物的繁殖器官,具有重要的经济价值。番茄果实是跃变型果实的典型代表,是研究该类果实成熟机理的模式材料。研究果实的发育和成熟机理将有利于提高果实的产量和改善品质。目前,通过基因芯片的方法,我们得到了大量与果实发育和成熟的基因(Fei *et al.*, 2004),但要快速的从大量的信息当中筛选出与果实成熟相关的目的基因,则需要我们建立一种适合果实基因功能研究的高通量分析方法。尽管我们成功建立了适合番茄整个生长发育阶段的 VIGS 体系,但该方法难以满足我们的上述要求。与转基因方法相比,利用番茄幼苗建立的 VIGS 的优点显而易见。但该方法单纯用于番茄的果实基因功能研究却有不足之处:该方法一株植物只适合研究一个目的基因,当需要大规模筛选时,需要很大的空间和工作量。

叶片侵染是 VIGS 中的常用方法,目前该方法在烟草(Liu *et al.*, 2004),番茄(Liu *et al.*, 2002a),大豆(Brigneti *et al.*, 2004),马铃薯(Faivre-Rampan *et al.*, 2004),木薯(Fofana *et al.*, 2004),矮牵牛(Chen *et al.*, 2004)和胡椒(Chung *et al.*, 2004)等植物中得到广泛应用。农杆菌不仅能有效的侵染植物的叶片,而且最近有文献报道根也是农杆菌的有效侵染部位(Ryu *et al.*, 2004)。根据这种思路,我们想试探建立专门用于研究番茄果实基因沉默的新方法,缩短果实成熟相关基因功能鉴定的时间。

本实验中我们通过离体果实的真空渗透,活体果实的果面,果柄和果茎等途径侵染番茄果实。研究发现 TRV 能有效的在番茄果实中进行复制和转移,导致番茄果实目的基因的沉默。通过比较几种侵染方法,我们发现果柄是 TRV 的最佳侵染部位,能导致番茄果实中目的基因沉默。

3.2 材料与试剂

3.2.1 植物材料

番茄品种(*Lycopersicon esculentum* cv *Ailsa Craig*)由重庆大学李正国教授惠赠

3.2.2 Southern 杂交用试剂

(1) 预杂交液 / 杂交液

0.5 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2); 1mmol/L EDTA (pH8.0); 7% SDS (*m/V*), 1%牛血清白蛋白 (*m/V*)。

(2) 20×SSC

用 800ml 水溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠, 用几滴 14mol/L HCl 调节 pH 至 7.0, 用水定容至 1L, 分装后高压灭菌。该试剂的终浓度为 3mol/L NaCl 和 0.3mol/L 柠檬酸钠。

1mol/L 磷酸盐缓冲液: 71g 无水 Na_2HPO_4 ($134 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 用 8ml 的 85%浓磷酸调节 pH 7.2, 用蒸馏水定容至 1L。

3.2.3 主要仪器设备

气相色谱 (日本岛津 GC-14C)

3.3 方法

3.3.1 离体番茄果实的真空渗透

选择绿熟期番茄果实作为实验材料。每 10 个番茄果实为一组。农杆菌 GV3101TRV-*LeACS2* 和农杆菌 GV3101TRV1 菌液浓度调整在 $\text{OD}_{600}=1.0\sim2.0$ 之间, 含空病毒载体的农杆菌侵染液为阴性对照。同时选择转反义 *LeACS2* 基因番茄果实为阳性对照。调整好的侵染液混匀, 在常温下静置 3h。把番茄果实放入农杆菌侵染液中, 淹没果实为止。在 30mmHg 的真空条件下维持 30s。缓慢释放真空度, 用干净吸水纸擦干番茄果实表面的剩余菌液。果实放置在阴凉通风处贮藏, 观察果实表面颜色变化。

3.3.2 番茄果实乙烯含量的测定

将番茄果实密闭在干燥器内, 1h 后抽气测定, 每个样品重复 3 次。乙烯含量采用岛津 GC-14C 气相色谱仪测定, GDX-502 填充柱, 柱长 1.5m, 氢火焰离子检测器检测, 载气为 N_2 , 燃气为 H_2 , 流量为 50ml/min, 检测器温度为 160℃, 进样口温度为 120℃, 柱温为 60℃。

3.3.3 番茄果实 ACC 含量分析

参照 Langebartels 等方法(1991)。取 2 克新鲜果肉组织加入 5ml (80%) 甲醇匀浆离心 (4000g/min, 15min)。上清转入新的离心管, 40℃ 旋转蒸发, 5.0ml 蒸馏水溶解。在青霉素小瓶中加入 0.8ml ACC 提取液和 0.1ml 50mmol·L⁻¹ HgCl_2 盖塞, 冰浴中冷却, 注入浴冷的 $\text{NaClO}:\text{NaOH}$ (2:1) 混合液, 剧烈振荡混匀, 冰浴中放置 2min, 从冰浴中取出小瓶, 剧烈振荡数秒, 取 1ml 气体测定乙烯。每个实验重复三次。

3.3.4 PCR Southern 杂交

3.3.4.1 转膜—碱转移法

- (1) 将电泳后的凝胶，切去多余部分，并切一角以标明方向。
- (2) 浸泡在 0.25mol/L HCl 中轻摇 15min，然后用蒸馏水冲掉 HCl。
- (3) 将一瓷盘内加入 0.4mol/L NaOH 溶液，架上一块玻璃板，玻璃板上铺上一张洁净的滤纸，滤纸两端浸于 NaOH 中，滤纸与玻璃板间不得有气泡。
- (4) 将凝胶倒扣（点样孔向下）于滤纸上，用玻璃棒滚动除去凝胶与滤纸间的气泡，凝胶四周安放隔水条。
- (5) 剪一张长宽大于凝胶 1mm 的尼龙膜，置于 0.4mol/L NaOH 中均匀浸透后，将湿润的膜准确盖于凝胶上，膜一经与凝胶接触，不可再移动。
- (6) 将两张与尼龙膜大小相同的滤纸，用 NaOH 浸湿后盖于尼龙膜上，排除气泡。
- (7) 滤纸上层放一叠与膜大小相同的吸水纸(8cm-10cm)，吸水纸上放一块玻璃板，玻璃板上压一块 0.5kg 重物，水平放置，转膜 20h 左右。
- (8) 转膜完毕后，取下吸水纸和滤纸，用铅笔在膜上描出点样孔位置。
- (9) 将膜于 2×SSC 浸泡 10min。
- (10) 将膜转移至滤纸上，在超净台上吹干。
- (11) 80℃烘膜 1h。
- (12) 用保鲜膜包裹，4℃保存或直接用于杂交。

3.3.4.2 杂交

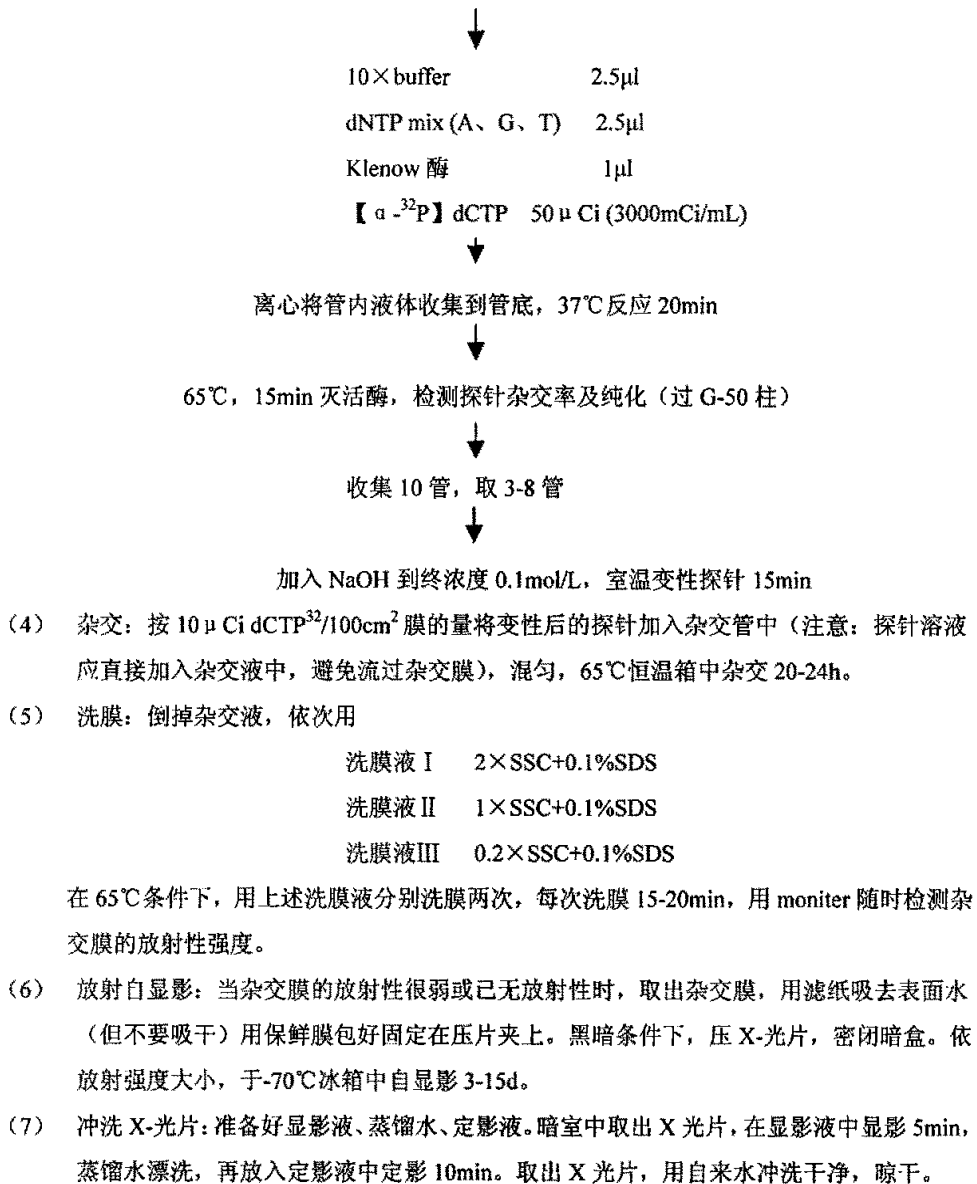
- (1) 平衡膜：将膜在 3×SSC，0.1% SDS 溶液中，65℃平衡 25min。
- (2) 将转移有 DNA 的 NC 膜先于杂交液中浸湿，迭在一起，赶尽气泡。于 65℃预杂交 5h-8h。
- (3) 随机引物法标记探针：

用 PCR 扩增获得的 RNA2 片段做探针，采用随机引物标记。在预杂交的同时标记探针，标记方法参照 TaKaRa 随机引物 DNA 标记试剂盒的说明。建立总体积为 25μl 的反应体系，在 1.5mL 的离心管中依次加入如下试剂：

RNA2 片段	3μl
随机引物 (Random Primer)	2μl
ddH ₂ O	9μl



95℃变性 10min，迅速放于冰上 5min，离心将管内液体收集到管底



3.4 结果与分析

3.3.1 TRV 侵染番茄果实

为了检测 TRV 能否直接侵染番茄果实。我们用含有 TRV 空载体的农杆菌侵染液采用以下方法对番茄果实进行侵染。离体果实的真空渗透; 用一次性注射器侵染活体果实的果柄, 果实表面和果茎。10d 后从远离侵染部位的番茄果实部位取样提取总 RNA。考虑到病毒载体的 mRNA 缺少 ployA 尾巴, 所以我们采用随机引物的方法通过反转录获得 cDNA。根据发表的 TRV 载体 pTRV2 的序列信息合成 RNA2 特异性引物。



图 3-1 烟草脆裂病毒侵染番茄果实的方式

Fig. 3-1 The infected method of TRV on tomato fruit

A, 果茎侵染; B, 果柄侵染; C, 果实表面侵染

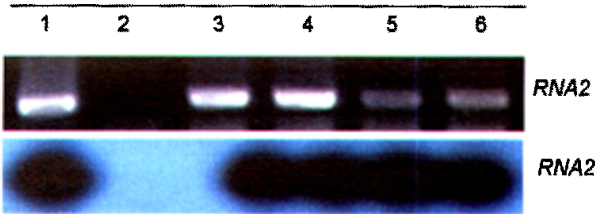


图 3-2 不同侵染方式侵染番茄果实中烟草脆裂病毒 RNA2 的 RT-PCR 和 PCR-southern 分析

Fig. 3-2 RT-PCR (Top row) and PCR-southern (Bottom row) analysis of TRV-RNA2 in tomato fruit infiltrated with the different method

1, RNA2 阳性对照; 2, RNA2 阴性对照; 3, 果茎侵染方式;

4, 果柄侵染方式; 5, 果实表面侵染方式; 6, 离体番茄果实真空渗透侵染方式

结果发现, 在上述四种用 TRV 侵染的果实中均检测到 RNA2 特异性片段, 而在未侵染果实

中没有检测到病毒的存在。RT-PCR southern 结果与上述结果一致。为了进一步证明 TRV 能有效的直接侵染番茄果实。回收 PCR 特异性片段，测序结果显示从侵染果实中扩增的片段与发表的序列一致(图 3-3)。这些结果说明 TRV 能通过真空渗透，果柄，果实表面和果茎等途径有效侵染番茄果实；TRV 通过上述途径在番茄果实中能有效的复制和转移，这为我们在番茄果实中建立 VIGS 体系提供了理论基础。

rna2	ACGGTTACGACGAACCAAGGGAGTACTACTACTACCAAGG	913
pcr_product	CGATTACGACGAACCAAGGGAGTACTACTACTACCAAGG	55
Consensus	ttacgacgaaccaagggagtactactactaccaagg	
rna2	CGAACACTGGCTCGACTTTGGAAGAAGACTTGTACACTTA	953
pcr_product	CGAACACTGGCTCGACTTTGGAAGAAGACTTGTACACTTA	95
Consensus	cgaacactggctcgactttggaagaagacttgtacactta	
rna2	TTACAAATTCGATGATGCCTCTACAGCTTTCACAAATCT	993
pcr_product	TTACAAATTCGATGATGCCTCTACAGCTTTCACAAATCT	135
Consensus	ttacaaattcgatgatgcctctacagctttccacaaatct	
rna2	CTAECTTCGTTAGAGAACATGGAGTTGAAGAGTTATTACC	1033
pcr_product	CTAECTTCGTTAGAGAACATGGAGTTGAAGAGTTATTACC	175
Consensus	ctaecttcgttagagaacatggagttgaagagttattacc	
rna2	GAAGGAACCTTTGAGAAAGTATTCGGGATTAAGTTTGGTGG	1073
pcr_product	GAAGGAACCTTTGAGAAAGTATTCGGGATTAAGTTTGGTGG	215
Consensus	gaaggaactttgagaaagtattcgggattaaagtttgggtgg	
rna2	AGCAGCTGCTAGTTCATCTGCACCGCCTCCAGCGAGTGGA	1113
pcr_product	AGTAGCTGCTAGTTCATCTGCACCGCCTCCAGCGAGTGGA	255
Consensus	ag agctgctagttcatctgcaccgcctccagcgagtggg	
rna2	GGTCCGATACGTCCTAATCCCTAGGGATTTAAGGACGTGA	1153
pcr_product	GGTCCGATACGTCCTAATCCCTAGGGATTTAAGGACGCGA	295
Consensus	ggtccgatacgtcctaataccctagggatttaaggacg ga	
rna2	ACTCTGTTGAGATCTCTGTGAAATTCAGAGGGTGGGTGAT	1193
pcr_product	ACTCTGTTGAGATCTCTGTGAAATTCAGAGGGTGGGTGAT	335
Consensus	actctgttgagatctctgtgaaattcagaggggtgggtgat	
rna2	ACCATATTCAGTGATGCCATTAGCGACATCTAAATAGGGC	1233
pcr_product	ACCATATTCAGTGATGCCATTAGCGACATCTAAATAGGGC	375
Consensus	accatattcactgatgccattagcgacatctaaatagggc	
rna2	TAATTGTGACTAATTTGAGGGAATTTCC	1261
pcr_product	TAATTGTGACTAATTT.....	391
Consensus	taattgtgactaattt	

图 3-3 RNA2 基因片段测序结果同源性比较

Fig. 3-3 Alingment of RNA2 gene fragment from tomato with RNA2 gene

3.4.2 离体番茄果实 VIGS 体系的建立

3.4.2.1 *LeACS2* 基因片段的克隆

根据已经发表的 *LeACS2* 基因序列(accession number: X59145), 设计合成一对特异性引物。为了构建病毒载体的需要, 在设计引物的同时分别在正义和反义引物的末端添加 *SacI* 和 *XbaI* 限制性酶切位点。从红熟期番茄果实提取总 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。结果如图 3-4 所示, 我们得到一条与预期大小一致的特异性扩增片段。回收片段连接到 pGEM-Teasy 用于测序, 测序结果与发表的目的基因预定区域一致, 说明我们成功的获得了 *LeACS2* 基因片段。

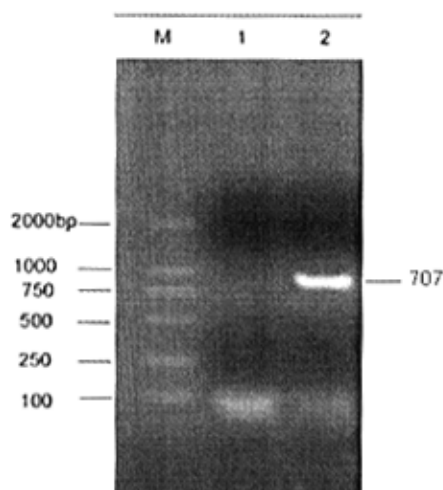


图 3-4 *LeACS2* 基因片段的 RT-PCR

Fig. 3-4. RT-PCR of a fragment of *PDS* gene

1, 阴性对照; 2, *LeACS2* 基因片段 RT-PCR; M, DL2000 分子量标准

3.4.2.2 病毒载体 TRV-*LeACS2* 的构建

用 *XbaI* 和 *SacI* 限制性内切酶对含有目的基因 *LeACS2* 片段的重组质粒 pGEM-Teasy 进行酶切, 同时对病毒载体 pYL156 进行酶切。回收相应大小的片段, 连接转化大肠杆菌。酶切鉴定大肠杆菌转化子质粒, 得到预期大小的片段, 说明我们成功构建了病毒载体 TRV-*LeACS2* (图 3-6)。通过冻融法把转化子质粒转入农杆菌 GV3101。选择合成的 *LeACS2* 特异性引物对农杆菌菌落进

行菌落 PCR, 以质粒 TRV-*LeACS2* 作为阳性对照。结果证明得到了含有病毒载体 TRV-*LeACS2* 的农杆菌转化子。该病毒载体如图 3-5 所示, 可以用于番茄果实基因沉默体系的建立。

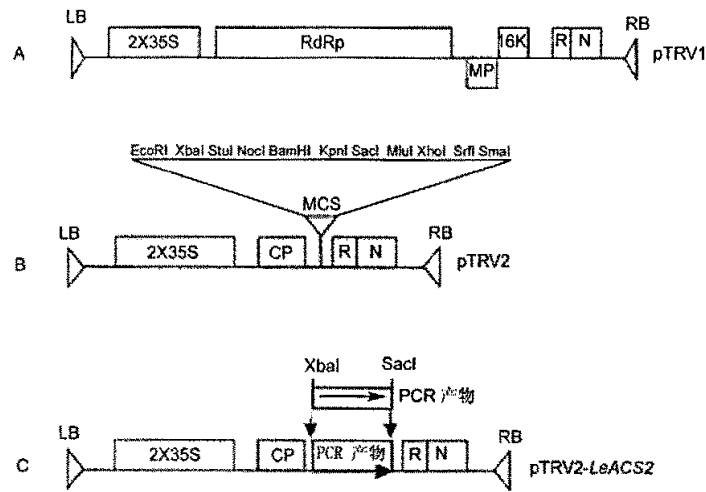


图 3-5 TRV-*LeACS2* 病毒载体结构

Fig. 3-5 Construction of TRV-*LeACS2* virus vector

A, pTRV1 结构; B, pTRV2 结构; C, pTRV2-*LeACS2* 结构

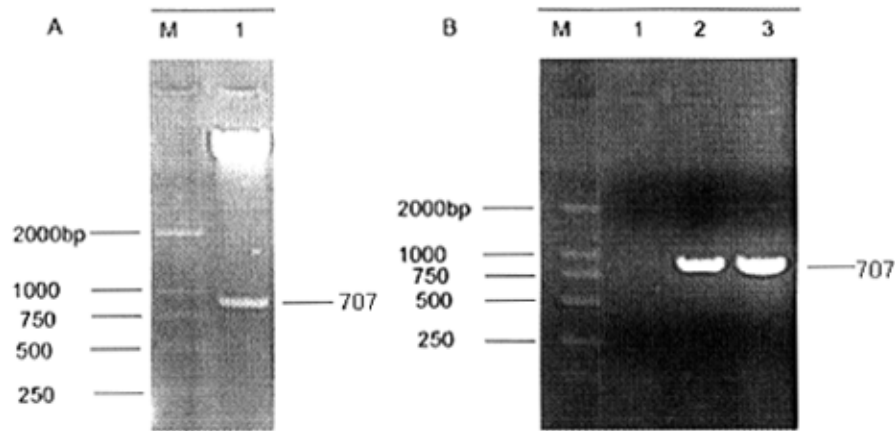


图 3-6 病毒载体 TRV-*LeACS2* 的构建和鉴定

Fig. 3-6 Construction and identification of TRV-*LeACS2* virus vector

A, 大肠杆菌质粒 TRV-*LeACS2* 的酶切检测 (*Xba*I+*Sac*I); B, 农杆菌质粒 TRV-*LeACS2* 的 PCR 检测
M, DL2000 分子量标准; 1, 阴性对照; 2, 阳性对照; 3, 农杆菌质粒 TRV-*LeACS2* 的 PCR

3.4.2.3 离体番茄果实 *LeACS2* 基因沉默表型分析

乙烯通过信号传导途径调节番茄果实的成熟过程(Alexander *et al.*, 2002a)。果实按照在成熟过程中是否出现乙烯释放高峰和呼吸高峰分为跃变型果实和非跃变型果实(Giovannoni, 2004)。番茄是典型的跃变型果实，在成熟过程中存在明显的乙烯释放高峰。*LeACS2* 在番茄果实成熟过程中特异性表达，与果实成熟过程中的乙烯大量合成有关。通过转基因的方法反义抑制该基因的表达，获得的转基因番茄果实出现不成熟表型(Hamilton *et al.*, 1995; Picton *et al.*, 1993)。所以 *LeACS2* 基因可以作为体外建立番茄果实基因沉默体系的报告基因，该基因沉默将出现成熟延迟表型，易于用肉眼观察。

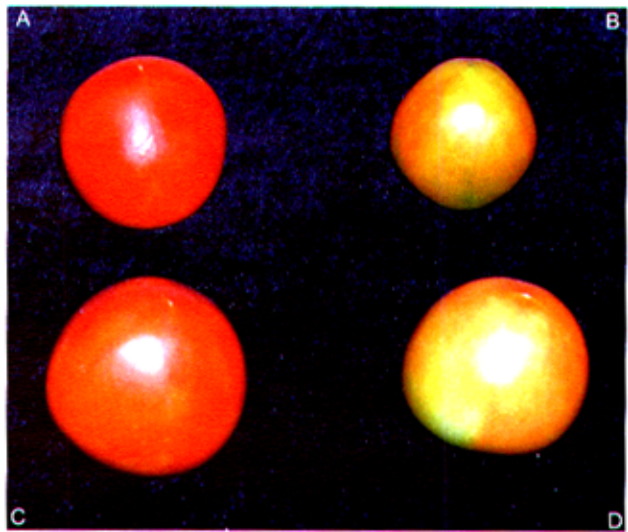


图 3-7 病毒载体 TRV-*LeACS2* 诱导的离体番茄果实 *LeACS2* 基因沉默

Fig. 3-7 Silencing of *LeACS2* gene in tomato fruit detached from the plant by vacuum-infiltration

A, 未渗透对照番茄果实表型; B, 转反义基因 *LeACS2* 转基因番茄果实表型;
C, TRV 渗透对照番茄果实表型; D, 病毒载体 TRV-*LeACS2* 渗透所诱导的 *LeACS2* 基因沉默番茄果实

我们选择绿熟期番茄果实作为体外真空渗透的材料，因为 *LeACS2* 基因在这个时期开始表达 (Barry *et al.*, 2000)。实验中用含有空病毒载体的农杆菌侵染作为阴性对照，转反义 *LeACS2* 基因转基因番茄作为阳性对照。在侵染过程中我们考虑了真空度，侵染液浓度，渗透时间等因素对基因沉默效果的影响。实验中发现渗透压过高会导致果实受损严重，果实容易腐烂；渗透时间过长也会导致相似结果。渗透压和时间过低又会导致渗透不完全。经过比较，我们发现在 300mmHg, 30s

的条件下能获得好的渗透效果。另外，侵染液浓度是影响离体番茄果实基因沉默效率的关键因素。实验中发现，在合理的渗透条件下，OD₆₀₀=1.0-1.5 的侵染液能获得好的侵染效果。

按照上述确定的侵染条件用病毒载体 TRV-*LeACS2* 侵染离体绿熟期番茄果实，TRV 侵染果实和未侵染果实为阴性对照，转基因果实作为阳性对照。侵染后果实放置在 20℃ 条件下阴凉通风处，观察果实表型变化。10d 后，我们发现对照果实中的空载体侵染果实和未侵染果实迅速变红（图 3-7 A, C）。转基因番茄果实表面出现黄色表型，TRV-*LeACS2* 侵染番茄果实也出现成熟被抑制表型，果实表面保持浅黄色，和转基因果实表型一致，而且这种表型能持续一个月以上（图 3-7 B, D）。这些比较结果表明 TRV-*LeACS2* 可能诱导了离体番茄果实目的基因 *LeACS2* 沉默。

3.4.2.4 *LeACS2* 沉默番茄果实的乙烯和 ACC 含量分析

ACC 是乙烯生物合成的直接前体。植物体内，ACC 由 ACC 合成酶催化合成。番茄中的 ACC 合成酶由基因家族组成。ACC 合成酶是乙烯生物合成途径中的限速酶，目前在番茄中克隆了 9 个 ACC 合成酶(Alexander *et al.*, 2002a)。其中 *LeACS2* 是与番茄果实成熟过程中的乙烯合成高峰密切相关，转基因番茄果实中该基因的有效抑制能降低番茄果实中的乙烯和 ACC 的生成量(Picton *et al.*, 1993)。

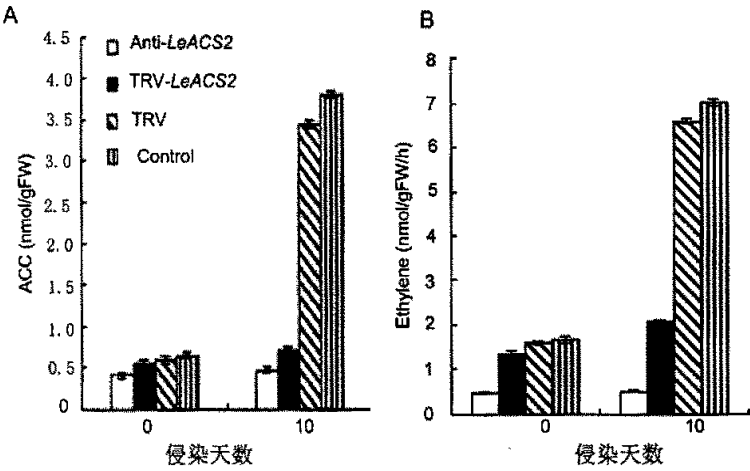


图 3-8 番茄果实的 ACC 含量和乙烯生成量气相色谱分析

Fig. 3-8 The ACC content and of ethylene production of tomato fruit

A, ACC 生成量; B, 乙烯生成量

为了研究 TRV-*LeACS2* 侵染番茄果实的黄色表型是否与 *LeACS2* 基因的沉默有关。我们分别从未侵染果实，TRV 侵染果实，TRV-*LeACS2* 侵染番茄果实和转基因果实中取样测定乙烯和 ACC

含量。结果显示, TRV-*LeACS2* 和转基因番茄果实中的乙烯和 ACC 明显低于对照果实 (图 3-8)。说明 TRV-*LeACS2* 成功诱导了离体番茄果实目的基因 *LeACS2* 的基因沉默, 抑制番茄果实的成熟过程。

3.3.4.5 *LeACS2* 基因沉默的 RT-PCR 半定量分析

为了在分子水平证明离体番茄果实目的基因 *LeACS2* 沉默。根据发表的 *LeACS2* 基因序列信息, 我们在病毒载体所包含目的基因片段外围设计合成一对特异性引物。分别从 TRV-*LeACS2* 和 TRV 侵染的番茄果实提取总的 RNA, 转反义 *LeACS2* 基因番茄和未侵染番茄果实为对照。*Ubi3* 基因在番茄的各个组织中的任何时期表达一致, 在 RT-PCR 中用来对 RNA 进行定量分析。根据目的基因半定量的需要, 我们分别对 *LeACS2* 和 *Ubi3* 基因进行 18, 21, 24, 27 和 30 个循环的扩增。结果显示, 内参照基因 *Ubi3* 在对照和沉默样品中的扩增趋势一致, 说明沉默和对照番茄样品中的 RNA 的定量准确。与未侵染红熟期对照番茄果实相比, 沉默番茄果实中的 *LeACS2* 目的基因的 mRNA 被显著降解, 相比之下降解了 76%。与转基因番茄果实相比, 沉默番茄的 mRNA 水平相差不大(图 3-9)。这说明了 TRV-*LeACS2* 诱导了番茄果实目的基因 *LeACS2* 的沉默。

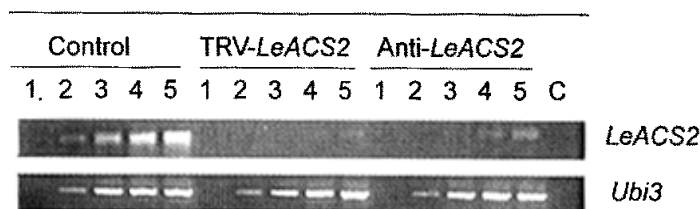


图 3-9 病毒诱导离体番茄果实 *LeACS2* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 3-9 RT-PCR analysis of the *LeACS2* gene in the *LeACS2*-silenced tomato fruit detached from the plant

1-5 为 PCR 循环次数分别为 21, 24, 27, 30 和 35; C, 阴性对照

从 TRV-*LeACS2* 沉默番茄果实的表型分析, ACC 和乙烯合成分析, 以及 RT-PCR 半定量分析表明 TRV 的真空渗透能有效的诱导离体番茄果实的基因沉默。

3.4.3 活体番茄果实 VIGS 体系的建立

病毒的体外真空渗透存在一定的局限性: 首先, 离体番茄果实由于脱离了植物体处理后容易

腐烂,实验结果表明,真空渗透的番茄果实有 65%腐烂。其次,离体果实得不到养分停止生长发育。再次,番茄果实成熟过程中的基因在表达过程中存在明显的时间和表达空间的特异性,所以在某一特定时期的离体番茄果实不适合研究番茄成熟相关的所有基因。在番茄植株上的番茄果实,在病毒侵染后其营养不受影响,能正常的生长发育。如果能在活体番茄果实上建立 VIGS 体系将有利于克服离体果实真空渗透带来的不足。

乙烯通过信号传导途径调节番茄果实的成熟过程,*LeCTR1* 是乙烯信号传导途径中的负调控因子。该基因突变体可导致番茄幼苗出现典型的乙烯三重反应(Leclercq *et al.*, 2002)。我们认为,当该基因沉默时会促进番茄果实的成熟。所以 *LeCTR1* 基因适合作为在番茄果实中建立基因沉默体系的报告基因。

3.4.3.1 果柄注射诱导番茄果实 *LeCTR1* 基因沉默

3.4.3.1.1 *LeCTR1* 基因片段的克隆

根据已经发表的 *LeCTR1* 基因序列(accession number: AF110518),我们设计合成一对特异性引物,两端分别添加 *SacI* 和 *XbaI* 限制性酶切位点。从红熟期番茄果实提取总 RNA 反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。结果如图 3-10 所示,我们得到一条 1346bp 特异性扩增片段。回收片段连接到 pGEM-Teasy 用于测序,测序结果与发表的目的基因预期区域一致,说明我们成功的获得了 *LeCTR1* 基因片段(图 3-10)。

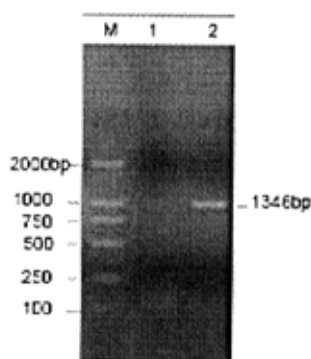


图 3-10 *LeCTR1* 基因片段的 RT-PCR

Fig. 3-10 RT-PCR of a fragment of *LeCTR1* gene

1, 阴性对照; 2, *LeCTR1* 基因片段 RT-PCR; M, DL2000 分子量标记

3.4.3.1.2 病毒载体 TRV-*LeCTR1* 的构建

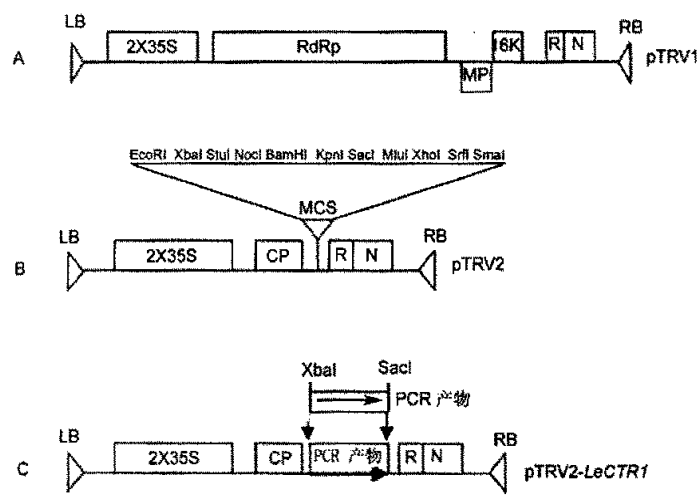


图 3-11 TRV-*LeCTR1* 病毒载体结构

Fig. 3-11 Construction of TRV-*LeCTR1* virus vector

A, pTRV1 结构; B, pTRV2 结构; C, pTRV2-*LeCTR1* 结构

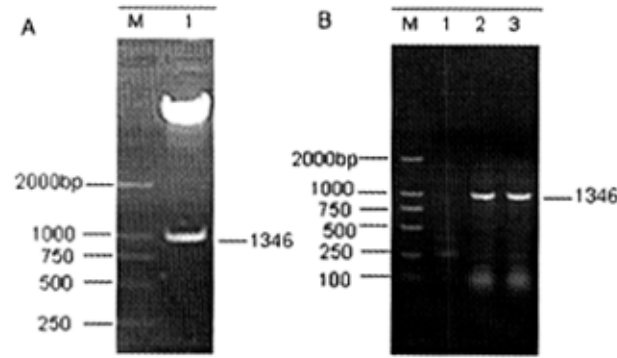


图 3-12 病毒载体 TRV-*LeCTR1* 的构建和鉴定

Fig. 3-12 Construction and identification of TRV-*LeCTR1* virus vector

A, 大肠杆菌质粒 TRV-*LeCTR1* 的酶切检测; M, DL2000 分子量标准; 1, 酶切鉴定 (*XbaI*+*SacI*)

B, 农杆菌质粒 TRV-*LeCTR1* 的 PCR 检测;

1, 阴性对照; 2, 阳性对照; 3, 农杆菌质粒 TRV-*CTR1* 的 PCR; M, DL2000 分子量标准

用 *XbaI* 和 *SacI* 限制性内切酶对含有目的基因 *LeCTR1* 片段的重组质粒 pGEM-Teasy 进行酶切, 同时对病毒载体 pYL156 进行酶切。回收相应大小的片段, 连接转化大肠杆菌。酶切鉴定大

肠杆菌转化子质粒，得到预期大小的片段，说明我们成功构建了病毒载体 TRV-*LeCTR1*。通过冻融法把转化子质粒转入农杆菌 GV3101。选择合成的 *LeCTR1* 特异性引物对农杆菌菌落进行菌落 PCR，以质粒 TRV-*LeCTR1* 作为阳性对照，结果证明得到了农杆菌转化子（图 3-12）。可以用于番茄果实 VIGS 体系的建立。

3.4.3.1.3 TRV 诱导番茄果实 *LeCTR1* 基因的沉默表型分析

我们已经证明 TRV 能有效侵染番茄果实表面，果柄和果茎。考虑到果茎侵染和果柄侵染不存在明显差别，他们具有共同的运输途径，而且果柄离果实距离更近。我们选择果实表面和果柄作为 TRV 侵染的部位。

选择花后 2 个星期的果实作为病毒果实注射的材料，果实太小不便操作。果实生长期太长也会影响到 *LeCTR1* 基因的沉默效果。另外，目的基因 *LeCTR1* 基因在番茄果实中表达有明显的增强趋势(Zegzouti et al., 1999)。选择花后 10d 左右的番茄果实作为果柄注射用的材料，因为选择发育期较早的番茄果实能使番茄发育的整个时期都能作为研究材料。侵染液的配制方法如前所述。用一次性注射器注射番茄的果实表面和果柄。果柄注射共进行三次，每隔 3d 一次。每组实验都选择含有 TRV 空载体的农杆菌注射作为阴性对照。



图 3-13 病毒载体 TRV-*LeCTR1* 诱导番茄果实 *LeCTR1* 基因沉默

Fig. 3-13 TRV mediated VIGS of the *LeCTR1* gene in tomato fruit attached to the plant

A, 病毒载体的番茄果实表面注射； B, 病毒载体的番茄果实果柄注射表型；

C, 未侵染对照粉红色番茄果实； D-F, *LeCTR1* 基因沉默番茄果实表型

随着果实的生长发育,我们发现果面注射 TRV-*LeCTR1* 病毒载体的番茄果实注射部位在注射后 4 个星期左右开始变红,同一果实的其它部位仍然保持绿色。同一生长发育时期的 TRV 注射番茄果实保持绿色(图 3-14 A)。对于果柄注射的番茄果实,我们发现在注射 TRV-*LeCTR1* 的果实的果柄周围表面首先出现红色表型,同一果实远离果柄部位仍然保持绿色未成熟表型。同一时期的 TRV 果柄注射果实和未侵染番茄果实的整个果实表面保持绿色(图 3-14 B)。比较 TRV-*LeCTR1* 注射番茄果实和未侵染番茄果实,我们发现,对照果实在成熟过程中的红色着色均匀(图 3-14 C)。而 TRV-*LeCTR1* 果柄注射番茄果实在成熟过程中出现一半红一半绿的特殊表型(图 3-14 F),仔细观察我们还会发现番茄果实的红色象云一样由番茄果柄部位向下运动(图 3-14 D, E)。进一步观察发现,果柄注射的番茄果实的绿色部分也会随着番茄果实的成熟过程变成红色。

上述实验表明 TRV-*LeCTR1* 的果实表面和果柄侵染均导致了侵染部位的提前成熟。这说明番茄果实表面和果柄是 TRV 的有效侵染部位。比较两种沉默果实的表型,我们发现果柄注射比果面注射效果更佳,影响面积更大。果实表面导致的基因沉默表型聚集在侵染部位很小的范围内,不容易扩散(图 3-13 A),而果柄注射的番茄果实沉默信号从果柄向番茄果实的整个表面延伸(图 3-13 D, E)。通过比较发现,果柄注射能更加有效的促进番茄果实的基因沉默。

3.4.3.1.4 *LeCTR1* 基因沉默的 RT-PCR 半定量分析

为了在分子水平证明 TRV 诱导的番茄果实目的基因 *LeCTR1* 沉默。根据发表的 *LeCTR1* 基因序列信息。我们在病毒载体所包含目的基因片段外围设计合成一对特异性引物。分别从 TRV-*LeCTR1* 侵染番茄果实的红色和绿色果实组织提取总的 RNA,红熟期 TRV 侵染番茄果实为对照。

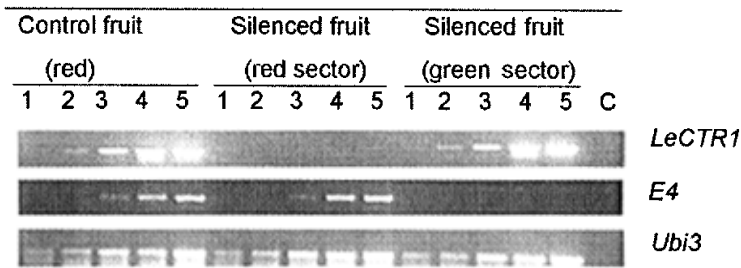


图 3-14 病毒诱导活体番茄果实 *LeCTR1* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 3-14 RT-PCR analysis of the *LeCTR1* gene in the *LeCTR1*-silenced tomato fruit attached to the plant

1-5 为 PCR 循环次数分别为 21, 24, 27, 30 和 35; C, 阴性对照

Ubi3 基因在番茄的各个组织中的任何时期表达一致, 作为 RT-PCR 中用来对 RNA 进行定量的内参照基因。为了对目的基因半定量的需要, 我们分别对目的基因和参照基因进行 18, 21, 24, 27 和 30 个循环的扩增。结果显示, 内参照基因 *Ubi3* 在对照和沉默样品中的扩增趋势一致, 说明沉默和对照番茄样品中的 RNA 定量准确。与未侵染红熟期对照番茄果实相比, 沉默番茄红色果肉组织中的目的基因 *LeCTR1* 的 mRNA 被显著降解, 相比之下降解了 94%。但沉默番茄果实的绿色组织中的 *LeCTR1* 目的基因的 mRNA 水平与对照红熟期番茄果实目的基因 *LeCTR1* 的 mRNA 水平相似。这说明了 TRV-*LeCTR1* 诱导了番茄果实目的基因 *LeCTR1* 的沉默。

E4 基因(accession number: S44898)在番茄红熟期特异性表达, 在番茄成熟的早期不表达, 所以它可以作为检测番茄果实是否成熟的一个标记基因(Alexander *et al.*, 2002a)。根据发表的 *E4* 基因序列, 我们设计一对特异性引物来检测沉默番茄和对照番茄果实不同发育时期的该基因表达情况。结果表明 *E4* 基因在 *LeCTR1* 沉默番茄果实的红色果肉组织和红熟期对照果实中特异性表达, 表明该果实组织已经成熟, 但是在 *LeCTR1* 基因沉默番茄果实的绿色组检测不到该基因的表达。

TRV-*LeCTR1* 沉默番茄果实的表型分析和 RT-PCR 半定量分析表明 TRV 诱导了番茄果实 *LeCTR1* 的基因沉默。比较两种方法, 我们发现果柄侵染能对番茄果实形成更有效侵染。

3.4.3.2 果柄注射诱导番茄果实 *LeEILs* 基因沉默

LeEILs 是番茄乙烯信号传导途径中的一个正调控因子, 调节番茄果实的成熟过程, 该基因由基因家族组成(Chen *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2002a)。目前在番茄果实中已经克隆了四个相关的 *LeEILs* 基因, 研究证明当采用反义 RNA 转基因技术同时抑制该家族三个成员表达时, 能有效的抑制转基因番茄果实的成熟过程(Tieman *et al.*, 2001)。为了进一步证明从番茄果柄能有效诱导番茄果实目的基因沉默, 我们选择 *LeEILs* 作为报告基因。

3.4.3.2.1 *LeEILs* 基因片段的克隆

根据已经发表的 *LeEILs* 基因序列(accession number: AF32876), 设计合成一对特异性引物。为了构建病毒载体的需要, 在设计引物的同时分别在正义和反义引物的末端添加 *SacI* 和 *XbaI* 限制性酶切位点。从红熟期番茄果实提取总 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。结果如图 3-15 所示, 我们得到一条与预期大小一致的特异性扩增片段。回收片段连接到 pGEM-Teasy 用于测序, 测序结果与发表的目的基因预期区域一致, 说明我们成功的获得了 *LeEILs* 基因片段。

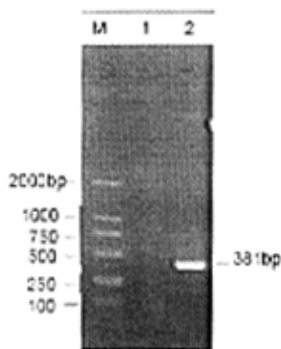


图 3-15 *LeEILs* 基因片段的 RT-PCR

Fig. 3-15 RT-PCR of a fragment of *LeEILs* gene

1, 阴性对照; 2, *LeEILs* 基因片段 RT-PCR; M, DL2000 分子量标准

3. 4. 3. 2. 2 病毒载体 TRV-*LeEILs* 的构建

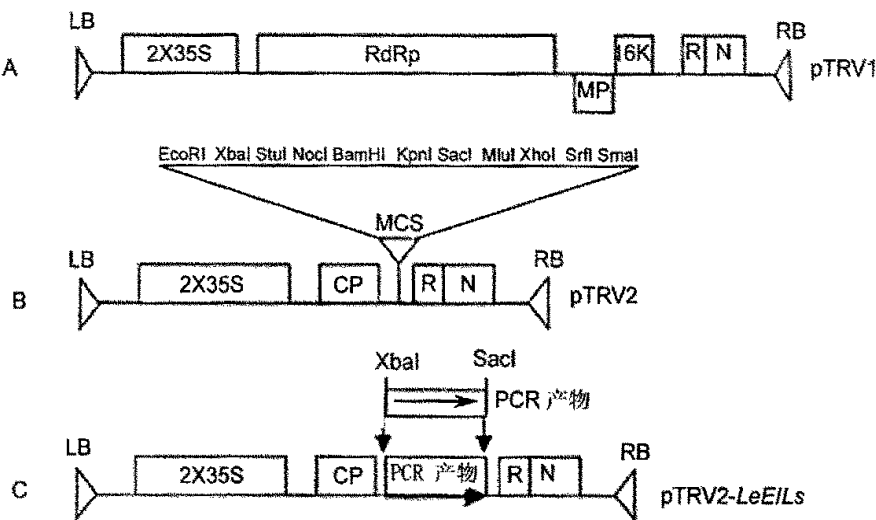


图 3-16 TRV-*LeEILs* 病毒载体结构

Fig. 3-16 Construction of TRV-*LeEILs* virus vector

A, pTRV1 结构; B, pTRV2 结构; C, pTRV2-*LeEILs* 结构

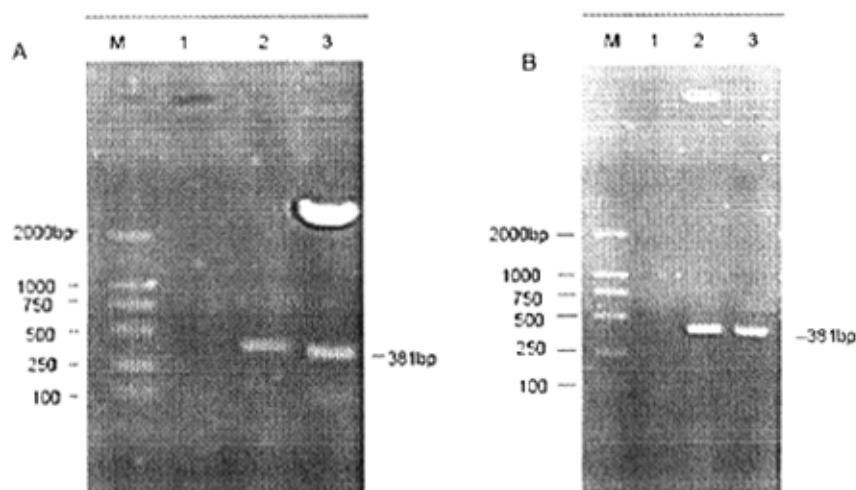


图 3-17 病毒载体 TRV-*LeEILs* 的构建和鉴定

Fig. 3-17 Construction and identification of TRV-*LeEILs* virus vector

A, 大肠杆菌质粒 pTRV-*LeEILs* 的酶切和 PCR 检测 (*Xba*I+*Sac*I);

M, DL2000 分子量标准; 1, 阴性对照; 2, PCR 检测; 3, 酶切检测 (*Xba*I+*Sac*I)

B, 农杆菌质粒 TRV-*LeCTR1* 的 PCR 检测

M, DL2000 分子量标准; 1, 阴性对照; 2, 阳性对照; 3, PCR 检测

用 *Xba*I 和 *Sac*I 限制性内切酶对含有目的基因 *LeEILs* 片段的重组质粒 pGEM-Teasy 进行酶切, 同时对病毒载体 pYL156 进行酶切。回收相应大小的片段, 连接转化大肠杆菌。酶切鉴定大肠杆菌转化子质粒, 得到预期大小的片段, 说明我们成功构建了病毒载体 TRV2-*LeEILs*。通过冻融法把转化子质粒转入农杆菌 GV3101。选择合成的 *LeEILs* 特异性引物对农杆菌菌落进行菌落 PCR。以质粒 TRV-*LeEILs* 作为阳性对照, 结果证明得到了含有病毒载体 TRV-*LeEILs* 的农杆菌转化子(图 3-17)。可以用于 VIGS 体系的建立。

3.4.3.2.3 TRV 诱导番茄果实 *LeEILs* 基因的沉默的表型分析

选择花后 10d 左右的番茄果实作为果柄注射用材料, 侵染液的配制方法如前所述。用一次性注射器注射番茄果柄。果柄注射共注射三次, 每隔 3d 一次。每组实验都选择含有 TRV 空载体的农杆菌注射作为对照。

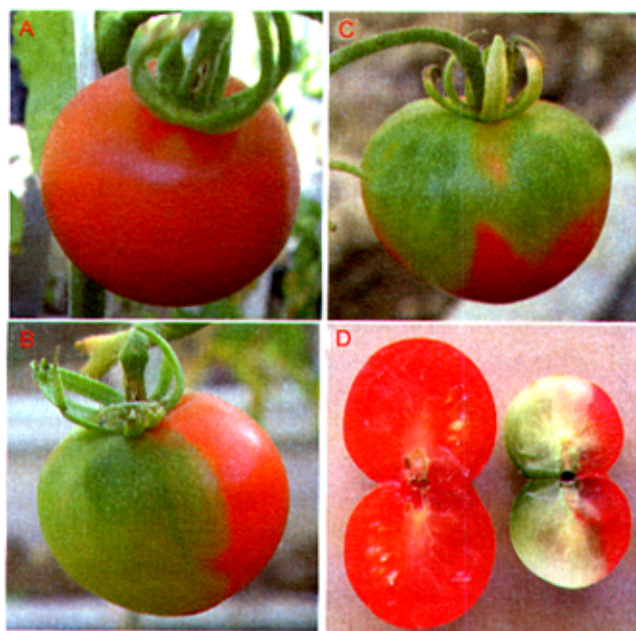


图 3-18 病毒载体 TRV-*LeEILs* 诱导活体番茄果实 *LeEILs* 基因沉默

Fig. 3-18 TRV mediated VIGS of the *LeEILs* gene in tomato fruit attached to the plant

A, 病毒载体 TRV 侵染的对照番茄果实; B-C, 病毒载体 TRV-*LeEILs* 侵染的番茄果实表型;

D, 对照番茄果实和 *LeEILs* 基因沉默番茄果实切面图

对于 TRV-*LeEILs* 注射番茄果实, 大约在侵染后 5-6 个星期, 果柄周围保持绿色, 而远离果柄部位却开始变红(图 3-18 B)。而同一时期 TRV 注射果实和未侵染对照番茄果实的整个表面变成红色(图 3-18 A)。比较 TRV-*LeEILs* 注射番茄果实和未侵染番茄果实, 我们发现, 对照果实在成熟过程中着色均匀, 而 TRV-*LeEILs* 注射番茄果实在成熟过程中出现一半红一半绿的特殊表型。仔细观察我们还会发现番茄果实的绿色象云一样由番茄果柄部位向下运动(图 3-18 C)。进一步观察发现, TRV-*LeEILs* 注射的番茄果实绿色部分不会随着番茄果实的成熟过程变成红色。当切开 *LeEILs* 沉默番茄果实和对照果实, 我们发现对照果实的果肉为红色而且有很多的种子, 但沉默番茄果实的果肉有大部分仍然保持绿色, 同一果实的其它部位变成红色, 绿色部分呈现未成熟表型(图 3-18 D)。

上述结果表明 TRV-*LeEILs* 病毒载体诱导了番茄果实的目的基因 *LeEILs* 沉默, 导致番茄果实出现成熟抑制表型, 与预期的结果一致。这进一步表明果柄是 TRV 侵染番茄果实引起目的基因沉默的有效部位。

3.4.3.2.4 *LeEILs* 基因沉默的 RT-PCR 半定量分析

为了在分子水平证明 TRV 诱导番茄果实目的基因 *LeEILs* 沉默。根据发表的 *LeEILs* 基因序列信息。我们在病毒载体所包含目的基因片段外围设计合成一对特异性引物。分别从 TRV-*LeEILs* 侵染番茄果实的红色和绿色果实组织提取总 RNA, 绿熟期 TRV 侵染番茄果实为对照。

Ubi3 基因在番茄中组成型表达, 作为 RNA 定量的内参照基因。为了满足 RT-PCR 半定量的需要, 我们分别对 *LeEILs* 和 *Ubi3* 基因进行 18, 21, 24, 27 和 30 个循环的扩增。结果显示, 内参照基因 *Ubi3* 在对照和沉默样品中的扩增趋势一致, 说明沉默和对照番茄样品中的 RNA 的定量准确。与未侵染绿熟期对照番茄果实相比, 沉默番茄绿色果肉组织中的目的基因 *LeEILs* 的 mRNA 被显著降解。但沉默番茄果实的红色组织中的 *LeEILs* 目的基因的 mRNA 水平与对照绿熟期番茄果实目的基因 *LeEILs* 的 mRNA 水平相似。这说明了 TRV-*LeEILs* 诱导了番茄果实目的基因 *LeEILs* 沉默。

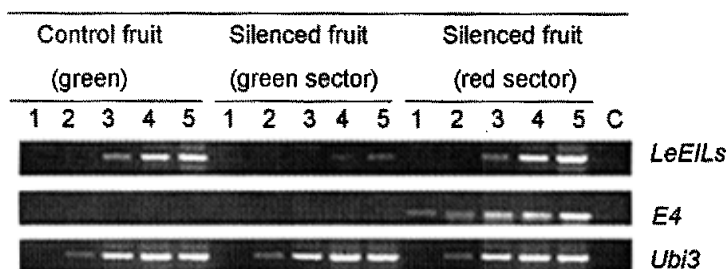


图 3-19 病毒诱导活体番茄果实 *LeEILs* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 3-19 RT-PCR analysis of the *LeEILs* gene in the *LeEILs*-silenced tomato fruit attached to the plant

1-5 为 PCR 循环次数分别为 21, 24, 27, 30 和 35; C, 阴性对照

E4 基因在番茄红熟期特异性表达, 可以作为检测番茄果实是否成熟的一个标记基因。结果表明 *E4* 基因在 *LeEILs* 沉默番茄果实的红色果肉组织特异性表达, 表明该果实组织已经成熟。在 *LeEILs* 基因沉默番茄果实的绿色组织和对照绿熟期果实中检测不到该基因的表达。

从 TRV-*LeEILs* 沉默番茄果实的表型分析和 RT-PCR 半定量分析表明 TRV 诱导了番茄果实 *LeEILs* 的基因沉默。

3.5 讨论

3.5.1 病毒侵染方式的选择

实验中我们发现 TRV 能通过离体番茄果实的真空渗透, 活体番茄果实的果柄和果实表面以及果茎注射等方式侵染番茄果实。通过 RT-PCR 能在远离侵染点的番茄果实部位检测到病毒的存在, 说明 TRV 能在番茄果实中复制和转运。

选择 *LeACS2* 基因作为报告基因研究绿熟期番茄果实体外真空渗透结果表明, TRV 成功的诱导了番茄果实目的基因 *LeACS2* 的基因沉默, 沉默番茄果实出现和转反义目的基因番茄果实相同表型; 成熟被显著抑制, 乙烯和 ACC 以及目的基因 *LeACS2* mRNA 含量与同一时期对照果实相比明显降低。体外真空渗透的侵染效率为 35%, 大部分果实在侵染后腐烂。另外, 体外真空渗透不适合研究在番茄特定时期表达的基因。离体番茄果实脱离番茄植株缺乏生长发育所必需的营养物质, 降低了抗虫, 抗病和抗腐烂能力。真空渗透会对整个番茄果实造成损伤, 容易造成番茄果实腐烂, 降低基因沉默效率。综上所述, 真空渗透诱导的离体番茄果实基因沉默体系不适合研究与番茄果实成熟相关基因的功能。

虽然果茎和果柄都是病毒侵染的有效部位, 但考虑到两者是利用了共同的病毒运输通道, 而且与果茎相比, 番茄的果柄离果实更近。所以我们选择番茄果实的果柄和果实表面作为活体番茄果实建立病毒诱导基因沉默的实验部位。*LeCTR* 作为报告基因的研究结果表明, 两种方式均导致了番茄果实侵染部位的番茄果实组织的提前成熟。但仔细观察我们发现, 果实表面注射的 *LeCTR1* 基因番茄果实的红色部位集中在侵染部位周围很小的区域内, 其它绝大部分组织不受影响。果柄注射的 *LeCTR1* 沉默番茄果实的沉默部位在果实的发育过程中不断扩大, 从上往下运动。出现明显的半个果实红和半个果实绿的特殊表型。另外, 果实表面侵染对果实造成损伤, 影响果实的美观。比较果实表面和果柄注射的 *LeCTR1* 基因沉默结果表明果柄注射是诱导活体番茄果实基因沉默的有效方法。*LeEILs* 基因的沉默进一步证明上述结果。另外, 实验中发现开花后 10d 左右的番茄果实是该体系建立的最佳材料, 可以用来研究番茄果实不同发育阶段的基因功能。

3.5.2 果柄注射方法的优越性

通过果柄注射建立的 VIGS 体系与研究果实成熟的传统方法相比具有以下优点:

1. 操作简单。采用传统的转基因方法得到转基因番茄果实需要经过复杂的遗传转化过程, 需要大量的人力和物力。该方法只需要经过构建载体和注射侵染程序, 操作简单, 需要的人力和物力较少。
2. 该方法节省时间。采用传统的转基因方法来研究番茄果实成熟相关基因的功能时需要 2-3 年时间才能完成整个基因的功能鉴定。采用果柄注射建立的 VIGS 研究番茄果实成熟过程中的

某一基因的功能只需要 40d, 为果实的一个发育时期。这大大节省了基因功能的研究时间, 加快了与果实成熟相关基因功能的研究进度。

3. 该方法可以用来研究与番茄成熟相关的任何基因, 而有些基因的转基因操作为导致转基因植株的死亡。
4. 该方法能在同一植株上进行多个基因的功能研究。我们的研究发现从番茄果柄导入的沉默信号运输具有方向性, 它能有效的被运送到被侵染果柄的番茄果实, 但不能运用到其它果实。这有利于进行与果实成熟相关基因功能的高通量分析。而转基因方法和上一章我们通过叶片所建立的 VIGS 方法均只能用于在单个植株上进行单个基因的功能分析。

3.5.3 沉默信号传导的迷惑

病毒真空渗透导致离体番茄果实的整个番茄果实出现目的基因的沉默是由于渗透使得病毒渗入到整个的番茄果实。但我们在活体果实侵染的研究中发现病毒在番茄果实中的运输存在不均匀现象, 沉默信号的分布存在区域性。例如对于 *LeEILs* 沉默的番茄果实我们发现该果实有一半保持绿色, 另一半保持红色。而且红色的部分和绿色部分之间的界限非常明显。*E4* 基因检测结果与表型一致。切开果实我们也发现该果实存在明显的绿色和红色两个部分。开始我们推测这种结果也许是与注射的部位有关, 也就是注射的那半个果实的目的基因沉默, 而另外部分不受影响。但同时我们发现通过叶片建立的病毒诱导建立的基因沉默体系的番茄果实也出现相同现象, 从而否认了我们的推测。该现象的具体机理有待进一步研究。

第四章 *LeEIN2*基因在番茄果实成熟调控中的作用

4.1 前言

EIN2 基因是植物体内乙烯信号传导途径中的一个关键组件, 该基因突变体幼苗表现出对乙烯的不敏感表型(Guo and Ecker 2004)。研究表明, *EIN2*基因编码蛋白位于植物的细胞膜上, 根据结构推测该蛋白参与植物体内金属离子的转运, 与哺乳动物NRAMP金属转运蛋白具有较高同源性(Alonso *et al.*, 1999)。目前, 在拟南芥, 水稻和矮牵牛中得到该基因的全长序列, 不存在基因家族(Alonso *et al.*, 1999; Jun *et al.*, 2004; Shibuya *et al.*, 2004)。该基因的突变表现很强的乙烯不敏感表型, 说明该基因在乙烯信号传导途径中起正调控作用。

番茄是研究跃变型成熟机理的模式材料, 乙烯通过信号传导途径调节跃变型果实的成熟过程, 与番茄果实的成熟过程息息相关(Alexander *et al.*, 2002b)。尽管目前在其它几个物种中成功的克隆了*EIN2*基因, 并完成了该基因的部分功能研究。但由于该基因序列较长, 一般4000bp左右, 而且不存在基因家族, 该基因在各个物种之间的保守性很低, 所以番茄中*LeEIN2*基因的全序列分析和功能研究到目前未见有相关文献报道。2004年, Chen 等报道了番茄*LeEIN2*基因的部分序列信息。采用上述建立的两种基因沉默方法, 我们成功地沉默番茄果实的目的基因*LeEIN2*, 通过研究确定该基因与番茄果实成熟之间关系。

4.2 材料与试剂

同第二章

4.3 方法

4.3.1 *LeEIN2* 基因片段克隆

4.3.1.1 引物的合成

根据 GenBank (accession number AY566238) 中已发表的 *LeEIN2* 基因的部分序列设计引物, 引物序列如下: 上游引物:TGG AAA TGT CCC TGTA.下游引物:CCC ATC ATC TTG CCTA 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

4.3.1.2 cDNA 的合成

按照 Promega 公司的 Reverse Transcription System Kit 说明进行, 建立总体积为 20 μl 的反转录反应体系。首先在 PCR 管中加入番茄果实总 RNA 2 μl ($\leq 1\mu\text{g}$), 1 μl Oligo (dT)₁₅ (500 μg / mL), 70 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 以破坏 RNA 的二级结构, 立即冰浴 5min, 离心将管内液体收集至管底。在冰上依次加入下列试剂: 4 μl 5 $\times$ M-MLV RT 缓冲液; 1 μl RNA 酶抑制剂 (40U/ μl); 2 μl dNTP_s (2.5mM, each); 1 μl M-MLV 反转录酶 (200U/ μl); DEPC 处理水 9 μl 。离心混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 灭活反转录酶, 立即冰浴 5 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

4.3.1.3 *LeEIN2* 基因的 PCR 扩增

建立 50 μl 的 PCR 反应体系: 5 μl 10 $\times$ *Ex Taq* 缓冲液; 2 μl 反转录反应产物 (cDNA); 1 μl 上游引物 (25 μM); 1 μl 下游引物 (25 μM); 4 μl dNTP_s (2.5mM, each); 0.25 μl *Ex Taq*TM DNA 聚合酶 (5U/ μl); 灭菌的蒸馏水 36.5 μl 。离心混匀, 在 HYBAID PCR 仪中 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 按以下程序进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物。

4.3.2 番茄基因组 DNA 的 Southern 杂交

4.3.2.1 番茄果实总 DNA 的大量提取: SDS 法

- (1) 取 2g 新鲜或冻存果实, 在液氮中研成粉末。
- (2) 将冻粉转入预冷的 50ml 离心管中, 立即加入 10ml 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的提取液 [100 mmol/L Tris.Cl pH8.0, 50 mmol/L EDTA pH8.0, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS, 10mmol/L-巯基乙醇 (使用前加入)], 充分混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20-30min, 期间不时摇动。
- (3) 加入 2.5ml 5mol/L KAC, 混匀, 冰浴 20min。
- (4) 加入 5ml 氯仿/异戊醇 (24: 1), 混匀, 轻摇 10min。
- (5) 6000g 离心 10min。
- (6) 取上清于新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1h。
- (7) 用枪头挑出絮状 DNA 沉淀, 置于 1.5ml 离心管中, 先用 70% 乙醇洗涤, 再用无水乙醇洗涤, 吹干 (不要过于干燥), 溶于适量的 TE 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 使其完全溶解。
- (8) 加入等体积的酚 / 氯仿各抽提一次, 12000g 离心 10min。
- (9) 上清转移到新的 Eppendorf 管中, 加入 RNaseA 至终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1h。
- (10) 加入等体积氯仿 / 异戊醇 (24: 1), 抽提一次, 12000g 离心 10min。

- (11) 转移上清至新Eppendorf 中, 加入10mol/L乙酸铵至终浓度为2.5mol/L。
- (12) 加入2-2.5倍体积的-20℃预冷无水乙醇, 混匀, -20℃放置30min。
- (13) 4℃, 12000g离心10min, 弃上清。
- (14) 沉淀用1ml 70%乙醇洗涤二次, 4℃, 12,000g离心10min, 弃上清, 吹干。
- (15) 溶于适量TE中。
- (16) 取1-2 μ l DNA 溶液在0.8%琼脂糖凝胶上检查DNA的质量并定量。
- (17) 其余DNA样品保存在-20℃备用。

4.3.2.2 植物基因组 DNA 的酶切

植物基因组 DNA 的酶切体系:

10 × Buffer	5 μ l
BSA	5 μ l
DNA 溶液	10 μ g
限制性内切酶	40U

补加灭菌水至 50 μ l

37℃酶解 12h 以上, 取 5 μ l 酶切反应物电泳, 检查酶切效果。

4.2.2.3 凝胶电泳分离目的片段

- (1) 配制 0.8%的琼脂糖凝胶电泳, 上样。
- (2) 100V 电压将所有样品从点样孔压入凝胶, 然后 30V 恒压, 电泳 16h。

4.2.3.4 转膜—碱转移法

- (1) 将电泳后的凝胶, 切去多余部分, 并切一角以标明方向。
- (2) 浸泡在0.25mol/L HCl中轻摇15min, 然后用蒸馏水冲掉HCl (当转膜片段小时可省略该步骤)。
- (3) 将一瓷盘内加入0.4mol/L NaOH 溶液, 架上一块玻璃板, 玻璃板上铺上一张洁净的滤纸, 滤纸两端浸于NaOH中, 滤纸与玻璃板间不得有气泡。
- (4) 将凝胶倒扣 (点样孔向下) 于滤纸上, 用玻璃棒滚动除去凝胶与滤纸间的气泡, 凝胶四周安放隔水条。
- (5) 剪一张长宽大于凝胶1mm的尼龙膜, 置于0.4mol/L NaOH中均匀浸透后, 将湿润的膜准确

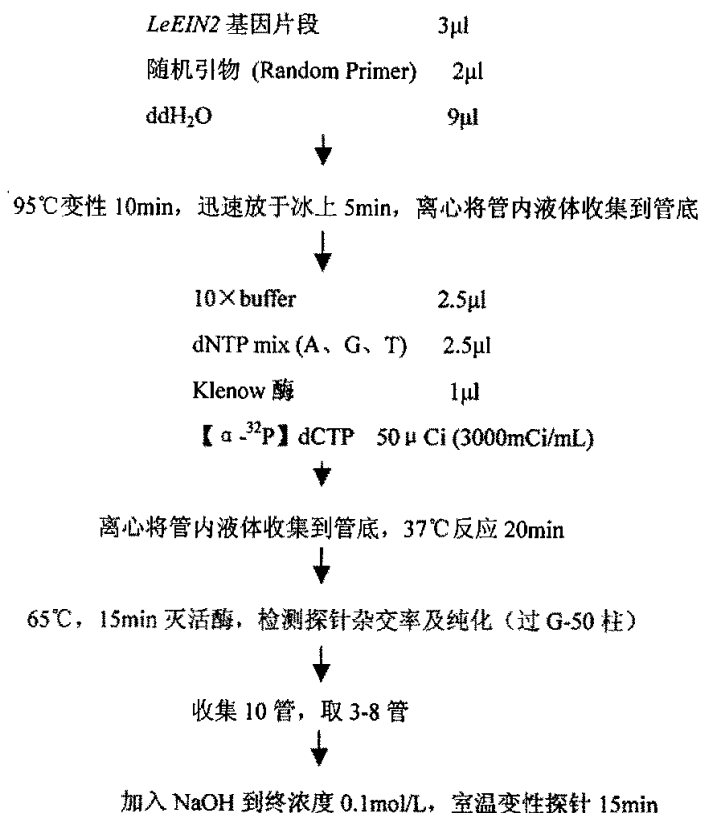
盖于凝胶上，膜一经与凝胶接触，不可再移动。

- (6) 将两张与尼龙膜大小相同的滤纸，用NaOH浸湿后盖于尼龙膜上，排除气泡。
- (7) 滤纸上层放一叠与膜大小相同的吸水纸(8cm-10cm)，吸水纸上放一块玻璃板，玻璃板上压一块0.5kg重物，水平放置，转膜20h左右。
- (8) 转膜完毕后，取下吸水纸和滤纸，用铅笔在膜上描出点样孔位置。
- (9) 将膜于2×SSC浸泡10min。将膜转移至滤纸上，在超净台上吹干。
- (10) 80℃烘膜1h。用保鲜膜包裹，4℃保存或直接用于杂交。

4.2.3.5 杂交

- (1) 平衡膜：将膜在 3×SSC, 0.1% SDS 溶液中，65℃平衡 25min。
- (2) 将转移有 DNA 的 NC 膜先于杂交液中浸湿，迭在一起，赶尽气泡。于 65℃预杂交 5h-8h。
- (3) 随机引物法标记探针：

用 PCR 扩增获得的 *LeEIN2* 基因片段做探针，采用随机引物标记。在预杂交的同时标记探针，标记方法参照 TaKaRa 随机引物 DNA 标记试剂盒的说明。建立总体积为 25μl 的反应体系，在 1.5mL 的离心管中依次加入如下试剂：



(4) 杂交: 按 $10\mu\text{Ci dCTP}^{32}/100\text{cm}^2$ 膜的量将变性后的探针加入杂交管中(注意: 探针溶液应直接加入杂交液中, 避免流过杂交膜), 混匀, 65°C 恒温箱中杂交 20-24h。

(5) 洗膜: 倒掉杂交液, 依次用

洗膜液 I $2\times\text{SSC}+0.1\%\text{SDS}$

洗膜液 II $1\times\text{SSC}+0.1\%\text{SDS}$

洗膜液 III $0.2\times\text{SSC}+0.1\%\text{SDS}$

在 65°C 条件下, 用上述洗膜液分别洗膜两次, 每次洗膜 15-20min, 用 monitor 随时检测杂交膜的放射性强度。

(6) 放射自显影: 当杂交膜的放射性很弱或已无放射性时, 取出杂交膜, 用滤纸吸去表面水(但不要吸干)用保鲜膜包好固定在压片夹上。黑暗条件下, 压 X-光片, 密闭暗盒。依放射强度大小, 于 -70°C 冰箱中自显影 3-15d。

冲洗 X-光片: 准备好显影液、蒸馏水、定影液。暗室中取出 X 光片, 在显影液中显影 5min, 蒸馏水漂洗, 再放入定影液中定影 10min。取出 X 光片, 用自来水冲洗干净, 晾干。

4.4 结果与讨论

4.4.1 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 构建

4.4.1.1 *LeEIN2* 基因片段的克隆

根据已经发表的序列, 设计合成一对特异性引物。为了构建病毒载体的需要, 在设计引物的同时分别在正义和反义引物的末端添加 *SacI* 和 *XbaI* 限制性酶切位点。从红熟期番茄果实提取总 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。结果如图 4-1 所示, 我们得到一条与预期大小一致的 568bp 的特异性扩增片段。回收片段连接到 pGEM-Teasy 用于测序, 测序结果与发表的目的基因预期区域一致, 说明我们成功的获得了 *LeEIN2* 基因片段。

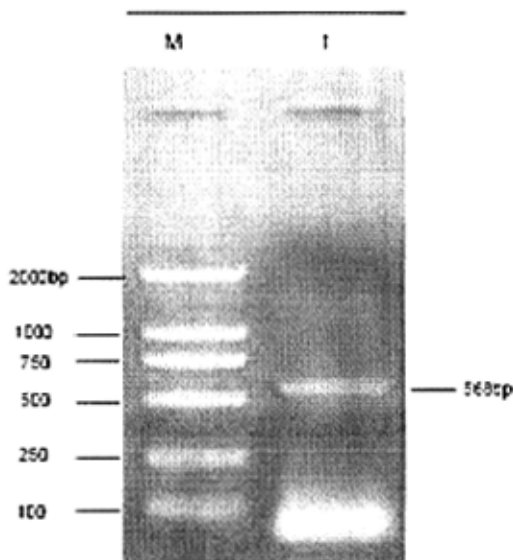


图 4-1 *LeEIN2* 基因片段的 RT-PCR

Fig. 4-1 RT-PCR of a fragment of *LeEIN2* gene

1, *LeEIN2* 基因片段 RT-PCR; M, DL2000 分子量标准

LeEIN2	CCGCTGCTTTTGGAAATGTCCTGTAGGCCGAAATAATT	40
LeEIN2_PCR	.GATTCGA TTTGGAAATGTCCTGTAGGCCGAAATAATT	39
Consensus	a t g tttggaaatgtccctgtaggccgaaataatt	
LeEIN2	CGATGCAGCCCACTAACACTACTTCCTCGACCATAGCTC	80
LeEIN2_PCR	CGATGCAGCCCACTAACACTACTTCCTCGACCATAGCTC	79
Consensus	cgatgcagcccaactaacactacttc ctcgaccatagctc	
LeEIN2	TACTGAAACTGCTGAAAGCGTGGCTGGTTTCAGCCAACTCT	120
LeEIN2_PCR	TACTGAAACTGCTGAAAGCGTGGCTGGTTTCAGCCAACTCT	119
Consensus	tactgaaactgctgaaagcgtggctggttcagccaaactct	
LeEIN2	AAGAAGTACTACAGCTTGCCTGATATCTCAGGGCGCTATG	160
LeEIN2_PCR	AAGAAGTACTACAGCTTGCCTGATATCTCAGGGCGCTATG	159
Consensus	aagaagtactacagcttgcctgatattctcagggcgctatg	
LeEIN2	TTCTTCGCCAAGATTCTATAGTGTGAGATCGGAGAGCTCA	200
LeEIN2_PCR	TTCTTCGCCAAGATTCTATAGTGTGAGATCGGAGAGCTCA	199
Consensus	t t c t t c g c c a a g a t t c t a t a g t g t c a g a t c g g a g a g c t c a	
LeEIN2	ATGGTACAAITCCATGGGATTCGGACAATCTGGTGGTCGA	240
LeEIN2_PCR	ATGGTACAAITCCATGGGATTCGGACAATCTGGTGGTCGA	239
Consensus	atggtacaaitccatgggattcggacaatctggtggtcgga	
LeEIN2	TCTACATACGAACAAGCCTATATGAGTGGTTCACTAAGGG	280
LeEIN2_PCR	TCTACATACGAACAAGCCTATATGAGTGGTTCACTAAGGG	279
Consensus	tctacatacgaacaagcctatatgagtggttcaactaaggg	
LeEIN2	CAGGTGGTCTCTCAGAGGTATGAACATTCCTCTAAAGTCTG	320
LeEIN2_PCR	CAGGTGGTCTCTCAGAGGTATGAACATTCCTCTAAAGTCTG	319
Consensus	cagggtggtctctcagaggtatgaacattctctctaaagtctg	
LeEIN2	CAGAGATGCATTCTCCTTGCAGTACAGCTCCAATTCAGGG	360
LeEIN2_PCR	CAGAGATGCATTCTCCTTGCAGTACAGCTCCAATTCAGGG	359
Consensus	c agagatgcattctccttgcagtacagctccaaltcaggg	
LeEIN2	ACTGGATCCCTGTGGTCTAGACAGCCTTTTGAGCAATTTG	400
LeEIN2_PCR	ACTGGATCCCTGTGGTCTAGACAGCCTTTTGAGCAATTTG	399
Consensus	actggatccctgtggtctagacagccttttgagcaatttg	
LeEIN2	GTGTAGCTGGTAAGCCAGATGTTGGTAGC GGCGATCATGG	440
LeEIN2_PCR	GTGTAGCTGGTAAGCCAGATGTTGGTAGT GGCGATCATGG	439
Consensus	gtgtagctggttaagccagatgttggtag ggcgatcatgg	
LeEIN2	AACITGTGCTGAGTTCTCTGCTCAAGAGAGTACATCTACG	480
LeEIN2_PCR	AACITGTGCTGAGTTCTCTGCTCAAGAGAGTACATCTACG	479
Consensus	aactgtgc gagttcctctgctcaagagagtacatctacg	
LeEIN2	GTTGACTTGGGAAGCTAAGCTGCTTCACTCTTTCAGAAGTT	520
LeEIN2_PCR	GTTGACTTGGGAAGCTAAGCTGCTTCACTCTTTCAGAAGTT	519
Consensus	gttgacttgggaagctaagctgcttca ctctttcagaagtt	
LeEIN2	GTATTGTGAAACTTTTGAACTGGGAAGGATCTGAGTGGTT	560
LeEIN2_PCR	GTATTGTGAAACTTTTGAACTGGGAAGGATCTGAGTGGTT	559
Consensus	gtattgtgaaacttttgaaactgggaaggatctgagtggtt	
LeEIN2	ATTAGGCCAAGATGATGGGCTGATGAGGATCTTATAGG	600
LeEIN2_PCR	ATTAGGCCAAGATGATGGGCTGATGAGGATCTTATAGG	598
Consensus	atttaggc aagatga et tg g	
LeEIN2		600
LeEIN2_PCR		611
Consensus	TGCAGGTCGACCA	

图 4-2 *LeEIN2* 基因片段测序结果同源性比较

Fig. 4-2 Alignment of *LeEIN2* gene fragment from tomato with *LeEIN2* gene

4.4.1.2 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 的构建

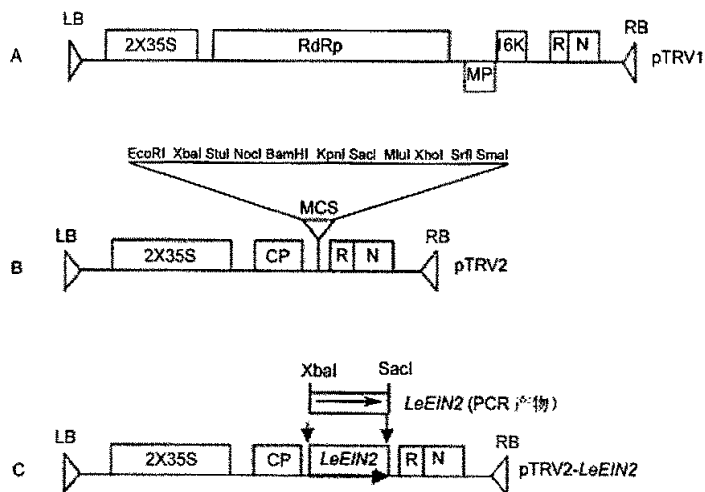


图 4-3 TRV-*LeEIN2* 病毒载体结构

Fig. 4-3 Construction of TRV-*EIN2* virus vector

A, pTRV1 结构; B, pTRV2 结构; C, pTRV2-*LeEIN2* 结构

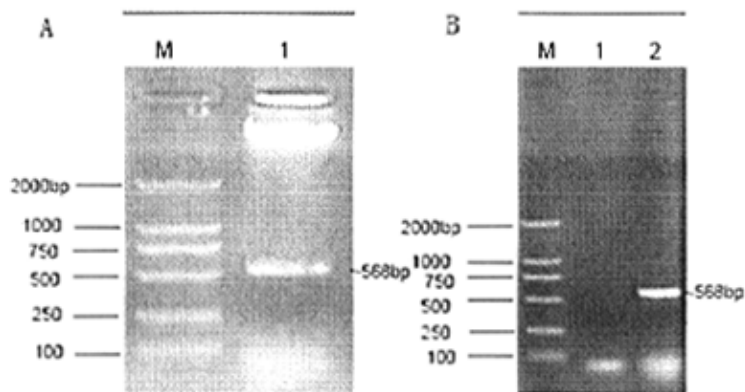


图 4-4 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 载体的构建和鉴定

Fig.4-4 Construction and identification of TRV-*LeEIN2*

A, 大肠杆菌质粒 TRV-*LeEIN2* 的酶切鉴定: M, DL 2000; 1, TRV-*LeEIN2* 双酶切(*XbaI*+*SacI*)

B, 农杆菌质粒 TRV-*LeEIN2* 的 PCR 鉴定: M, DL 2000; 1, 阴性对照; 2, *LeEIN2* PCR

用 *Xba*I 和 *Sac*I 限制性内切酶对含有目的基因 *LeEIN2* 的片段的重组质粒 pGEM-Teasy 进行酶切, 同时对病毒载体 pYL156 进行酶切。回收相应大小的片段, 连接转化大肠杆菌。酶切鉴定大肠杆菌转化子质粒, 得到预期大小的片段, 说明我们成功构建了病毒载 TRV-*LeEIN2*(图 4-4 A)。通过冻融法把转化子质粒转入农杆菌 GV3101。选择合成的 *LeEIN2* 特异性引物对农杆菌菌落进行菌落 PCR, 结果证明得到了农杆菌转化子(图 4-4 B)。可以用于 VIGS 体系的建立。

4.4.2 *LeEIN2* 基因拷贝数分析

为了检验 *LeEIN2* 基因在番茄基因组中的拷贝数。我们以上述合成的 *LeEIN2* 基因片段为探针进行 Southern。分析该基因片段的限制性酶切位点, 发现该基因片段缺乏 *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点。所以我们选择上述四种限制性内切酶酶切番茄基因组 DNA。Southern 杂交结果表明均得到单一条带(图 4-5), 这说明番茄基因组中只有单个 *LeEIN2* 基因。



图 4-5 番茄基因组 DNA southern 杂交

Fig.4-5 Southern blotting of tomato DNA with *LeEIN2*

- 1, 番茄基因组 DNA *Eco*RI 酶切; 2, 番茄基因组 DNA *Hind*III 酶切;
3, 番茄基因组 DNA *Sac*I 酶切; 4, 番茄基因组 DNA *Xba*I 酶切

4.4.3 果柄注射诱导番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默

4.4.3.1 *LeEIN2* 基因沉默表型分析

为了研究 *LeEIN2* 基因与番茄果实成熟之间的关系。我们采用 TRV-*LeEIN2* 侵染开花后 10d 左右的番茄幼果的果柄部位, 同时选择 TRV 空载体侵染为阴性对照。随着番茄果实的生长发育, 我们发现对照番茄果实能正常的成熟, 番茄果实表面呈现红色, 而 TRV-*LeEIN2* 侵染的番茄果实出现成熟抑制表型。*LeEIN2* 基因沉默番茄果实在成熟的后期出现半个果实红色和半个果实绿的表型, 而且绿色表型不会随着番茄果实的发育变化而变化, 该表型与上一章我们所观察到的 *LeEILs* 基因沉默表型一致(图 4-6)。沉默番茄果实的表型说明 *LeEIN2* 基因在番茄果实成熟过程中扮演着重要的作用, 它通过乙烯信号传导途径正向调节番茄果实的成熟过程。



图 4-6 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 诱导番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默

Fig. 4-6 TRV mediated VIGS of the *LeEIN2* gene in tomato fruit

A, 病毒载体 TRV 侵染的对照番茄果实; B, 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 侵染的番茄果实表型

4.4.3.2 目的基因 *LeEIN2* 的 RT-PCR 分析

为了在分子水平检测目的基因 *LeEIN2* 的基因沉默, 我们对目的基因进行了 RT-PCR 检测。从绿色对照果实, 沉默番茄果实的绿色组织和红色组织分别提取番茄果实总的 RNA, 反转录合成 cDNA。在病毒载体所包含的目的基因的外围区域合成一对特异性引物。各个组织的目的基因 *LeEIN2* 基因的 RT-PCR 半定量结果表明, 沉默番茄的绿色组织和绿熟期对照果实组织相比, *LeEIN2* 的 mRNA 被显著降解, 这说明了目的基因 *LeEIN2* 发生了基因沉默(图 4-7)。另外, 与果实成熟相关基因 *E4* 的 RT-PCR 结果表明, *LeEIN2* 沉默番茄果实绿色组织中和对照绿熟期番茄果

实没有该基因的表达，沉默番茄果实的红色组织 *E4* 表达量较高(图 4-7)，*E4* 的检测结果进一步证明 *LeEIN2* 调控番茄果实的成熟过程，该基因的沉默能有效的抑制番茄果实的成熟。

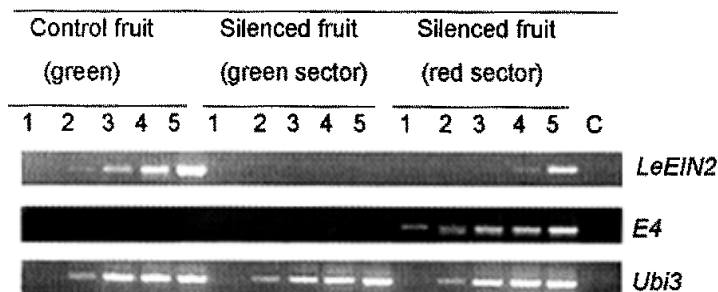


图 4-7 病毒诱导番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 4-7 RT-PCR analysis of the *LeEIN2* gene in the *LeEIN2*-silenced tomato fruit

1-5 为 PCR 循环次数分别为 21, 24, 27, 30 和 35; C, 阴性对照

4.4.4 叶片侵染诱导番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默

4.4.4.1 *LeEIN2* 基因沉默果实表型分析

为了进一步证明 *LeEIN2* 基因对番茄在生长发育过程中所起到的作用。我们按照第一章采用的方法，选择四叶期番茄幼苗进行 TRV 载体 TRV-*LeEIN2* 的侵染，同时选择 TRV 空载体侵染为对照。随着番茄植株的生长发育，我们发现 TRV-*LeEIN2* 侵染的番茄植株生长矮小。这说明该基因与番茄植株的生长发育有关。但是花的表型有对照相比没有明显变化。随着番茄果实的生长发育，我们发现对照番茄果实能正常成熟，红熟期番茄果实切开后果肉保持红色，出现软化表型(图 4-8 A, C)。 *LeEIN2* 基因沉默番茄果实出现不完全成熟表型，果实表面出现部分绿色和部分红色表型，该表型不会随着番茄果实的生长发育而变化。切开 *LeEIN2* 沉默番茄果实，我们发现果实内部出现部分绿色和部分红色果肉表型，而且绿色组织的硬度很高，红色部分已经软化(图 4-8 B, D)。这些结果再次证明了 *LeEIN2* 基因的沉默能有效的抑制番茄果实的成熟过程。

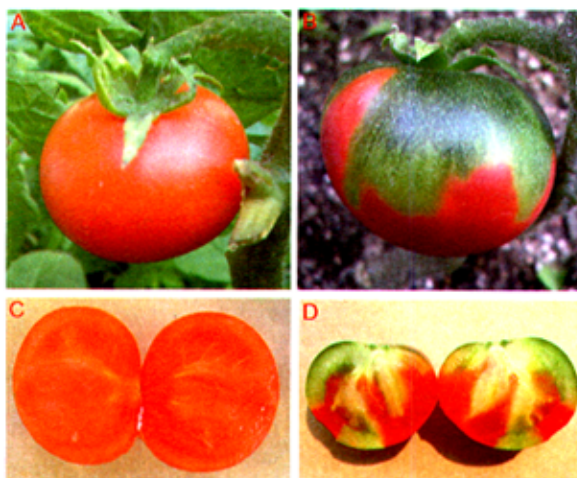


图 4-8 病毒载体 TRV-*LeEIN2* 诱导番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默

Fig.4-8 TRV mediated VIGS of the *LeEIN2* gene in tomato fruit

A, 病毒载体 TRV 侵染的对照番茄果实; B, 病毒载体 TRV-*EIN2* 侵染的番茄果实表型;
C, 对照番茄果实切面图; D, *LeEIN2* 基因沉默番茄果实切面图

4.4.4.2 沉默番茄果实 *LeEIN2* 基因 RT-PCR 分析

为了在分子水平检测目的基因 *LeEIN2* 的基因沉默, 我们对目的基因进行了 RT-PCR 检测。从绿色对照果实, 沉默番茄果实的绿色组织和红色组织分别提取番茄果实总的 RNA, 反转录合成 cDNA。在病毒载体所包含的目的基因的外围区域合成一对特异性引物。各个组织的目的基因 *LeEIN2* 基因的 RT-PCR 半定量结果表明, 沉默番茄果实的绿色组织与沉默番茄的红色组织和对照番茄果实红色组织相比, *LeEIN2* 的 mRNA 被显著抑制, 这说明了目的基因 *LeEIN2* 发生了基因沉默(图 4-9)。实验中选择 *Ubi3* 基因作为半定量的内参基因, 该基因在番茄的任何时期和任何部位的表达一致, 可以作为各个样品 RNA 定量的内参基因。

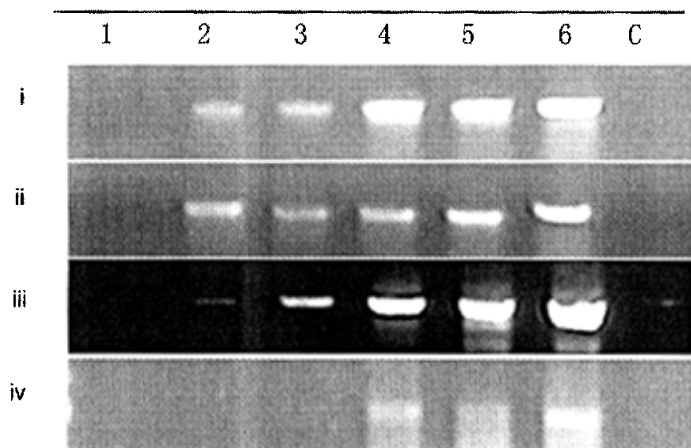
图 4-9 病毒诱导 *LeEIN2* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig.4-9 RT-PCR analysis of the *LeEIN2* gene in the fruit of the *LeEIN2*-silenced tomato plant

i, 对照样品 *Ubi3* 内参照基因的 RT-PCR 分析;

ii, 基因沉默样品 *Ubi3* 内参照基因的 RT-PCR 分析;

iii, 对照果实样品的 *LeEIN2* 目的基因的 RT-PCR 分析;

iv, 基因沉默果实样品 *LeEIN2* 基因的 RT-PCR 分析

1-6 分别为 18, 21, 24, 27, 30 和 35 PCR 循环次数。C: 为阴性对照

4.5 讨论

果实根据在成熟过程中是否出现乙烯释放高峰和呼吸高峰被分为跃变型果实成熟和非跃变型果实。乙烯通过信号传导途径调节跃变型果实的成熟过程。*LeEIN2* 基因是番茄乙烯信号传导途径中的一个关键元件。我们通过 TRV 介导的 VIGS 体系成功地诱导了番茄果实中 *LeEIN2* 基因沉默。随着番茄果实的成熟过程, 与对照番茄果实相比, *LeEIN2* 基因沉默番茄果实的成熟过程被显著抑制, 出现番茄果实的不成熟表型。实验结果 *LeEIN2* 基因调节番茄果实的成熟过程, 是乙烯信号传导途径中对果实成熟起正调控作用。

上述实验进一步表明我们建立的由 TRV 介导的 VIGS 体系是番茄果实成熟相关基因功能研究的有效方法。比较病毒诱导的番茄果实沉默基因技术与传统的转基因方法, 我们发现该方法具有以下优点。1, 该方法操作简单, 不需要遗传转化。2, 完成与果实成熟相关基因的功能研究的时间比较短, 果柄注射法需要 40d 左右, 叶片注射法需要 4 个月左右, 而转基因操作需要 1-2 年。3, 该方法所需要费用低, 完成一个新的基因功能需要 200-300 元, 而转基因操作需要 10000 元左右。综上所述, 我们建立的方法将加速番茄果实成熟相关基因功能研究的步伐。

第五章 全文总体结论与展望

5.1 全文总体结论

1. 选择八氢番茄红素去饱和酶基因(*PDS*)作为在番茄幼苗中建立 VIGS 体系的报告基因。研究发现, 在温度为 15℃, 相对湿度 15% 的环境条件下, 番茄幼苗叶片在侵染后约 50 天出现 *PDS* 沉默所引起的光漂白表型。与对照相比, 沉默叶片的叶绿素被降解 90%。随着番茄植株的生长, *PDS* 沉默番茄植株的繁殖器官均出现沉默表型; 花瓣变白, 成熟番茄果实呈现浅黄色表型。高效液相色谱分析(HPLC)表明 *PDS* 沉默番茄植株叶片, 花和果实中八氢番茄红素大量积累, 而破色期和红熟期 *PDS* 沉默番茄果实番茄红素被降低了 98%。RT-PCR 半定量分析表明沉默番茄植株的叶片, 花和果实中的 *PDS* 基因 mRNA 被显著降解。结果表明我们在番茄幼苗中成功建立了 VIGS 体系, 目的基因沉默效果能传递到番茄的繁殖器官。
2. 实验发现烟草脆裂病毒能通过离体果实真空渗透, 活体果实果柄, 果面和果茎注射等方式侵染番茄果实, 病毒能在番茄果实中复制和转移。选择 *LeACS2* 作为报告基因, 体外真空渗透有效抑制了番茄果实的成熟过程。与对照番茄果实相比, *LeACS2* 沉默番茄果实乙烯和 ACC 合成量显著降低。选择 *LeCTR1* 和 *LeEILs* 基因为报告基因, 实验结果表明果柄注射是活体番茄果实的有效侵染方式。*LeCTR1* 基因沉默促进了番茄果实的成熟过程; 相反 *LeEILs* 基因沉默番茄果实呈现不成熟表型。番茄果实 VIGS 体系的建立有利于番茄成熟相关基因的大规模功能分析, 采用该方法完成 1 个果实成熟相关基因的功能鉴定只需 40 天左右。
3. 番茄基因组 DNA 的 southern 杂交表明 *LeEIN2* 基因由单拷贝组成。在番茄幼苗和果实 中建立的 VIGS 技术均导致了番茄果实 *LeEIN2* 基因沉默, 沉默番茄果实呈现明显的成熟抑制表型。这进一步说明了我们建立的两 VIGS 体系适合研究番茄果实的成熟机理, 也说明 *LeEIN2* 基因在番茄果实成熟过程中扮演重要角色, 对番茄果实的成熟过程起正调控作用。

5.2 本研究的创新点

1. 通过改变环境条件, 使得番茄苗期产生的基因沉默持续到生殖生长阶段, 该方法可以替代反义转基因操作, 目前国际上未见此类报道。
2. 首次直接在番茄果实中建立了 VIGS 体系, 果柄注射方法的建立大大加速了番茄果实成熟机理的研究进程。(该研究结果被 *The plant journal* 杂志接收发表)
3. 采用我们建立的 VIGS 体系, 首次证明 *LeEIN2* 基因参与番茄果实的成熟过程。

5.3 研究展望

利用在番茄果实中建立的 VIGS 体系,在同一植株的不同果实之间进行不同基因的功能研究。通过大规模的高通量分析找到调节番茄果实成熟的关键基因,为改善果实的品质和提高产量提供理论基础。

参 考 文 献

- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni JJ. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 2004, 9: 1360~1385
- Aharoni A, O'Connell AP. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* 2002, 53: 2073~2087
- Alexander L, Grierson D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 2002a, 53: 2039~2055
- Alexander L, Lin Z, Chen G, *et al.* Ethylene signaling in ripening tomato fruit. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology.* 2002b, 132: S97
- Alkharouf NW, Matthews BF. SGMD: the Soybean Genomics and Microarray Database. *Nucleic Acids Res.* 2004, 1: D398~400
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, *et al.* EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 1999, 284: 2148~2152
- Angenent GC, Linthorst HJM, Belkum AF, *et al.* RNA2 of tobacco rattle virus strain TCM encodes an unexpected gene. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14: 4673~4682
- Balague C, Watson CF, Turner AJ, *et al.* Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur. J. Biochem.* 1993, 212: 27~34
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, *et al.* Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 1996, 9: 525~535
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.* 2000, 123: 979~986
- Baulcombe DC. Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol.* 1999, 2: 109~113
- Baulcombe DC. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431: 356~363
- Benedito VA, Visser PB, Angenent GC, *et al.* The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet Mol. Res.* 2004, 3: 323~341
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409: 363~366
- Bilgin DD, Liu Y, Schiff M, *et al.* P58 (IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev. Cell*, 2003, 4: 651~661

- Bleecker AB, Esch JJ, Hall AE, *et al.* The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 1998, 353: 1405~1412
- Bleecker AB, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* 2000, 16: 1~40
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, *et al.* AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 1998, 17: 170~180
- Bramley, PM. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 2002, 53: 2107~2113
- Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin H, *et al.* Virus-induced gene silencing in *Solanum species*. *Plant J.* 2004, 39: 264~272
- Brigneti G, Voinnet O, Li W-X, *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 1998, 17: 6739~6746
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, *et al.* Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 2004, 39: 734~746
- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, *et al.* Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*, 2000, 12: 691~706
- Chang C, Stewart RC. The two-component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* 1998, 117: 723~731
- Chao QM, Rothenberg M, Solano R, *et al.* Activation of the ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 1997, 89: 1133~1144.
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, *et al.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 2004, 18: 1179~1186
- Chen G, Alexander L, Grierson D. Constitutive expression of EIL-like transcription factor partially restores ripening in the ethylene-insensitive *Nr* tomato mutant. *J. Exp. Bot.* 2004, 55: 1491~1497
- Chen JC, Jiang CZ, Gookin TE, *et al.* Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Mol. Biol.* 2004, 55: 521~530
- Chen X, Liu J, Cheng Y, *et al.* *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development*, 2002, 129: 1085-1094
- Chung E, Seong E, Kim YC, *et al.* A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *Bukang*). *Mol. Cells*, 2004, 17: 377~380
- Ciardi J, Klee H. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *ANN Bot-london*, 2001, 88: 813~822
- Clark KL, Larsen PB, Wang XX, *et al.* Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the

- ETR1 and ERS ethylene receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 5401~5406.
- Cogoni C, Macino G.** Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. Curr. Opin. Gene.t Dev. 2000 10: 638~643
- Cogoni C, Romano N, Macino G.** Suppression of gene expression by homologous transgenes. Antonie Van Leeuwenhoek.1994, 65: 205~209
- Constantin GD, Krath BN, Macfarlane SA, et al.** Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a *legume species*. Plant J. 2004, 40: 622~631
- Coupe SA, Deikman J.** Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes. Plant J, 1997, 11: 1207~1218
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, et al.** An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell, 2000, 101: 543~553
- Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH et al.** SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. EMBO J. 2001, 20: 2069~2077
- DellaPenna D, Lincoln JE, Fischer RL, et al.** Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit. Plant Physiol, 1989, 90: 1372~1377
- Dinesh-Kumar SP, Anandalakshmi R, Marathe R, et al.** Virus-induced gene silencing. Methods Mol. Biol. 2003, 236: 287~294
- Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, et al.** Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. Plant Cell, 2004, 16: 1235~1250
- Elmayan T, Balzergue S, Beon F, et al.** *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell*, 1998, 10: 1447~1457
- Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, et al.** Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. Plant Physiol. 2004, 134: 1308~1316
- Fei Z, Tang X, Alba RM, et al.** Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. Plant J. 2004, 40: 47~59
- Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM.** Post-transcriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila. Curr. Biol. 2003, 13: 236~240
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391: 806~811
- Fitzmaurice WP, Holzberg S, Lindbo JA, et al.** Epigenetic modification of plants with systemic RNA viruses. Omics, 2002, 6: 137~151

- Fofana IB, Sangare A, Collier R, *et al.* A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Mol. Biol.* 2004, 56: 613~624
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, *et al.* application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* 2000, 24: 551~558
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, *et al.* Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 1994, 105: 405~413
- Giovannoni JJ. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 2004, 16 Suppl: S170~80
- Giovannoni JJ. MOLECULAR BIOLOGY OF FRUIT MATURATION AND RIPENING. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001, 52: 725~749
- Golden TA, Schauer SE, Lang JD, *et al.* SHORT INTEGUMENTS1/ SUSPENSOR1/ CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2002, 130: 808~822
- Gossel V, Fache I, Meulewaeter F, *et al.* SVISS - a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J.* 2002, 32: 859~866
- Gray J, Picton S, Shabbeer J, *et al.* Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.* 1992, 19: 69~87
- Gregory TW, Margaret GR, Jone GS. A procedure for the small-scale isolation of plant suitable for RNA blot analysis. *Anal. Biochem.* 1988, 172: 279~283
- Griffiths A, Barry C, Alpuche-Solis AG, *et al.* Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 1999, 50: 793~798
- Guo H, Ecker JR. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004, 7: 40~49
- Guo S, Kempthues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81: 611~620
- Hackett RM, Ho CW, Lin ZF, *et al.* Antisense inhibition of the Nr gene restores normal ripening to the tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiol.* 2000, 124: 1079~1085
- Hall LN, Bird CR, Picton S, *et al.* Molecular characterisation of cDNA clones representing pectin esterase isozymes from tomato. *Plant Mol. Biol.* 1994, 25: 313~318
- Hamilton A, Lycett GW, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 1990, 346: 284~287
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D. Two classes of short interfering RNA in RNA

- silencing. *EMBO J.* 2002, 21: 4671~4679
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D.** Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 7434~7437
- Hamilton AJ, Fray RG, Grierson D.** Sense and antisense inactivation of fruit ripening genes in tomato. *Curr. Top. Microbiol.* 1995, 197: 77~89
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404: 293~296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al.** Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 2001, 293: 1146~1150
- Hedden P, Phillips AL.** Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotech.* 2000, 11: 130~137
- Herrera-Estrella L, Simpson J, Martinez-Trujillo M.** Transgenic plants: an historical perspective. *Methods Mol. Biol.* 2005, 286: 3~32
- Holdsworth MJ, Schuch W, Grierson D.** Organization and expression for a wound/ripening-related small multigene family from tomato. *Plant Mol.Biol.* 1988, 11: 81~88
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al.** Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 2002, 30: 315~327
- Jin H, Axtell MJ, Dahlbeck D, et al.** NPK1, a MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev. Cell*, 2002, 3: 291~297
- Jun SH, Han MJ, Lee S, et al.** OsEIN2 is a positive component in ethylene signaling in rice. *Plant Cell Physiol.* 2004, 45: 281~289
- Kende H.** Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 1993, 44: 283~307
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, et al.** CTR1, a negative regulator of the ethylene response way in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 1993, 72: 427~441
- Kim M, Yang KS, Kim YK, et al.** Molecular characterization of NbPAF encoding the alpha6 subunit of the 20S proteasome in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Cells*, 2003, 15: 127~132
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, et al.** Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J.* 1998, 14: 91~100
- Klee HJ.** Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol.* 1993, 102: 911~916
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, et al.** Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92: 1679~1683
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, et al.** The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 1994, 6: 521~530

- Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, *et al.* Biochemical plant responses to ozone: differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 1991, 95: 882~889
- Lashbrook CC, Tieman DM, Klee HJ. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.* 1998, 15: 243~252
- Leclercq J, Adams-Phillips LC, Zegzouti H, *et al.* *LeCTR1*, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiol.* 2002, 130: 1132~1142
- Lee SS, Cho HS, Yoon GM, *et al.* Interaction of NtCDPK1 calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 2003, 33: 825~840
- Li WX, Ding SW. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotech.* 2001, 12: 150~154
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 1987, 148: 350~382
- Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, *et al.* *Le-ACS4*, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 19422~19430
- Lincoln JE, Cordes S, Read E, *et al.* Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84: 2793~2797
- Lincoln JE, Fischer RL. Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and rin tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Physiol.* 1988, 88: 370~374
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, *et al.* Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 1993, 5: 1749~1759
- Liu Y, Nakayama N, Schiff M, *et al.* Virus induced gene silencing of a *DEFICIENS* ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 2004, 54: 701~711
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 2002a, 31: 777~786
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, *et al.* Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 2002b, 30: 415~429
- Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol.* 2000, 123: 971~978
- Lu CG, Zainal Z, Tucker GA, *et al.* Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene. *Plant Cell*, 2001, 13: 1819~1833
- Lucioli A, Noris E. Tomato yellow leaf curl Sardinia virus rep-derived resistance to homologous

- Lui Y, Hoffman NE, Yang SF. Promotion by ethylene of the capacity to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruit. *Plant Physiol.* 1985, 77: 407~411
- MacFarlane SA, Popovich AH. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology.* 2000, 267: 29~35
- MacFarlane SA. Molecular biology of the tobnaviruses. *J. Gen. Virol.* 1999, 80: 2799~2807
- Mallory AC, Ely L, Smith TH, *et al.* HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, 2001, 13: 571~583
- Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, *et al.* Analysis of a *piwi*-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell*, 2002, 110, 689~699
- Moore S, Vrebalov J, Payton P, *et al.* Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.* 2002, 53: 2023~2030
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, *et al.* Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 2000, 101: 533~542
- Muangsan N, Robertson D. Geminivirus vectors for transient gene silencing in plants. *Methods Mol Biol.* 2004, 265:101~115
- Muller-Dieckmann HJ, Grantz AA, Kim SH. The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure with Folding and Design*, 1999, 7: 1547~1556
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, *et al.* Differential expression and internal feedback regulation of AAC synthase, ACC oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.* 1998, 118: 1295~1305
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2: 279~289
- Nicholass FJ, Smith CJS, Schuch W, *et al.* High-levels of ripening-specific reporter gene-expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol. Biol.* 1995, 28: 423~435
- Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 2001, 107: 415~418
- Nykänen A, Haley B, Zamore P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, 107, 309~321
- Odile Faivre-Rampant2, Eleanor M, *et al.* Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves and Tubers of Potato. *Plant Physiol.* 2004, 134: 1308~1316
- Oeller PW, Wong LM, Taylor LP, *et al.* Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense

- RNA. Science, 1991, 254: 437~439
- Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY, *et al.* Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol. Biol. 1997, 34: 275~286
- Olson DC, White JA, Edelman L, *et al.* Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 5340~5344
- Pat-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Drosophila*. Mol. Cell. 2002, 9: 315~327
- Palmer KE, Rybicki EP. Investigation of the potential of maize streak virus to act as an infectious gene vector in maize plants. Arch. Virol. 2001, 146: 1089~10104
- Park W, Li J, Song R, *et al.* CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, an HEN1, a novel protein, act in micro RNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol. 2002, 12: 1484~1495
- Payton S, Fray RG, Brown S, *et al.* Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. Plant Mol. Biol. 1996, 31: 1227~1231
- Pear JR, Ridge N, Rasmussen R, *et al.* Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding clone from tomato. Plant Mol. Biol. 1989, 13: 639~651
- Peart JR, Cook G, Feys BJ, *et al.* An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. Plant J. 2002, 29: 569~579
- Peele C, Jordan CV, Muangsang N, *et al.* Silencing of a meristem gene using geminivirus-derived vectors. Plant J. 2001, 27: 357~366
- Pfeffer S. Identification of virus-encoded microRNAs. Science, 2004, 304: 734~736
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, *et al.* Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. Plant J. 1993, 3: 469~481
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. Plant J. 2001, 25: 237~245
- Raz V, Fluhr R. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. Plant Cell, 1993, 5: 523~530
- Richmond T, Somerville S. Chasing the dream: plant EST microarrays. Curr. Opin. Plant Biol. 2000, 3: 108~106
- Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. Annu Rev Plant Biol. 2004, 55: 495~519
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. Science, 1999, 283: 996~998

- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, *et al.*** Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 2001, 20: 5556~5567
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB.** Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 5955~5960
- Rothstein SJ, DiMaio J, Strand M, *et al.*** Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987 84: 8439~8443
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, *et al.*** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 937~961
- Rui Lu1, Isabelle Malcuit, Peter Moffett.** High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance *The EMBO J*, 2003, 22: 5690~5699
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC.** Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, 10: 937~946
- Ryu CM, Anand A, Kang L, *et al.*** Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous species*. *Plant J.* 2004, 40: 322~331
- Schiebel, W, Pelissier T, Riedel L, *et al.*** Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, 1998, 10, 2087~2101
- Shibuya K, Barry KG, Ciardi JA, *et al.*** The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. *Plant Physiol.* 2004, 136: 2900~2912
- Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK, *et al.*** The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1998, 95: 10334~10339
- Sitrit Y, Bennett AB.** Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. *Plant Physiol.* 1998, 116: 1145~1150
- Solano R, Stepanova A, Chao QM, *et al.*** Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Deve.* 1998, 12: 3703~3714
- Spanu P, Grosskopf DG, Felix G, *et al.*** The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein- phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol.* 1994, 106: 529~535
- Spanu P, Reinhardt D, Boller T.** Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its messenger-RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 1991, 10: 2007~2013
- Stearns JC, Glick BR.** Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception.

- Biotechnology Adv. 2003, 21: 193~210
- Tatsuki M, Mori H. Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. J. Biol. Chem. 2001, 276: 28051~28057
- Taverna SD, Coyne RS, Allis DC. Methylation of histone H3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in *Tetrahymena*. Cell, 2002, 110: 701~711
- Theologis A, Oeller PW, Wong LM, *et al.* Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. Deve. Genet. 1993, 14: 282~295
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, *et al.* Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. Plant J. 2001, 26: 47~58
- Tieman DM, Klee HJ. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. Plant Physiol. 1999, 120: 165~172
- Tieman DV, Taylor MG, Ciardi JA, *et al.* The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 5663~5668
- Trentmann SM. ERN1, a novel ethylene-regulated nuclear protein of Arabidopsis. Plant Mol. Biol. 2000, 44: 11~25
- Turnage MA, Muangsang N, Peele CG, *et al.* Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. Plant J. 2002, 30: 107~114
- Valentine T, Shaw J, Blok VC, *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. Plant Physiol. 2004, 136: 3999~4009
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, *et al.* Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 4766~4771
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotianabenthiana*. Cell, 2000, 103: 157~167
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, *et al.* A MADS-box gene necessary for fruit ripening at tomato Ripening-inhibitor (Rin) locus. Science, 2002, 296: 343~346
- Wang K, Li H, Ecker J. Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell, 2002, 14: S131~S151
- Waterhouse PM, Wang M-B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature, 2001, 411: 834~842
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. Plant J. 2001, 27(6): 581-590

- Wilkinson J, Lanahan M, Yen H, *et al.* An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science*, 1995, 270: 1807~1809
- Wong WS, Ning W, Xu PL, *et al.* Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Mol. Biol.* 1999, 41: 587~600
- Xu RL, Goldman S, Coupe S, *et al.* Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative cis elements. *Plant Mol. Biol.* 1996, 31: 1117~1127
- Yamamoto M, Miki T, Ishiki Y, *et al.* The synthesis of ethylene in melon fruit during the early-stage of ripening. *Plant Cell Physiol.* 1995, 36: 591~596
- Yang SF, Hoffman NE. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984, 35: 155~189
- Yip WK, Moore T, Yang SF. Differential accumulation of transcripts for 4 tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 2475~2479
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101: 25~33
- Zarembinski TL, Theologis A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol.* 1994, 26: 1579~1597
- Zegzouti H, Jones B, Frasse P, *et al.* Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.* 1999, 18: 589~600
- Zhou DB, Kalaitzis P, Mattoo AK, *et al.* The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.* 1996, 30: 1331~1338
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299: 716~719
- 傅达奇, 李正国. 植物乙烯信号传导的研究进展. *中国生物工程杂志*. 2002, 22: 34~41
- 傅达奇, 朱本忠, 罗云波等. 植物中病毒诱导基因沉默的研究进展. *中国生物工程杂志*. 2005, 1: 89~95
- 高俊凤 <<植物生理学实验技术>>. 世界图书出版公司.

致 谢

忠心感谢我的导师罗云波教授,在2001年为我提供了来中国农业大学采后生物技术实验室学习的机会,使得我有机会开始接触分子生物学这一让我向往已久的专业。硕士毕业后,罗老师又为我提供了继续攻读博士学位的机会,使得我能在他的指导下继续学习新的知识和涉及新的研究领域。本论文是在导师罗云波教授的悉心指导下完成的,从论文的选题,实验的设计到结果的分析 and 论文的写作完成,每一步都凝聚着导师的智慧和心血。在这前后近5年的学习生活中,导师渊博的知识、严谨的治学态度,不懈的科研追求,忘我的工作精神为我们树立了无言的榜样,它时刻在感染和鞭策着我。导师坦荡的胸怀,平和的性格,教给我许多为人处世的道理。

特别感谢实验室的朱本忠老师,感谢他多年来在学习,工作和生活上给予我的帮助和支持,感谢他在实验过程中给予的启迪。感谢田惠琴老师在实验管理上给予的支持和帮助。感谢黄昆仑老师,曲桂琴老师,叶剑荣老师和芮玉奎老师给予的帮助、支持和鼓励。感谢同界学友张红星博士,实验中的相互帮助让我们彼此了解,共同进步。感谢郝艳玲老师在实验中给予的帮助以及为我论文所提出的宝贵意见和建议。

感谢中国农业大学生物学院王学臣教授,王国英教授,袁明教授,食品科学与营养工程学院姜微波教授,中国科学院植物所田世平教授在论文评审过程中所提出的宝贵意见。

在此我要特别的感谢我工作中的伙伴朱鸿亮、谢远红和崔宇三位师弟,他们在我实验最为困难的时候和我并肩作战,相互鼓励。他们的帮助让我能克服所面临的困难,他们是我的亲密战友。在此毕业之际,衷心的祝愿他们学业有成。感谢实验室的师弟师妹,他们的加入让我们的实验室变的朝气蓬勃,充满活力。

感谢耶鲁大学 S. P. Dinesh-Kumar 教授为我们提供重要的实验材料。感谢法国 Jean-Claude Pech 和 Mondher Bouzayen 教授,希腊 Angelos Kanellis 教授,中国农业大学生物学院讲座教授 simonrayner 在论文修改过程中提供的帮助。

特别感谢姜微波教授在英文文章写作过程中给予的极大帮助。难忘那次您我放弃回家过年的机会在一起修改文章的时刻。您那种严谨的治学态度,深厚的英文写作功底让我敬佩不已。您给予我的帮助让我永生难忘。同时,我还要感谢我的硕士生导师李正国教授及师母多年来在生活和学习上给予的关心和帮助。

特别感谢我的父母及家人在我多年求学期间一直在默默的支持我,家人的鼓励和支持是我不断前进的动力。在这即将结束这近20年的求学经历的时候,我要特别感谢我的二叔,他是我求学道路上的指路明灯。在我幼年不懂事的时候,是他的教导让我学会了坚持,学会了在重要的转折关头永不放弃。叔叔的教诲、鼓励和帮助影响了我的人生道路。

特别感谢我的爱人赵晓丹。三年的求学时光让我们彼此理解,互助。她的鼓励和乐观的处世态度让我从容的面对所遇到的困难。

最后,对所有支持和帮助过我的老师和同学及朋友表示深深的敬意和最衷心的感谢!

傅达奇

2005.6.06

作者简历

傅达奇, 男, 1975年10月出生, 江西德安县人。1998年毕业于江西农业大学职业技术师范学院, 获得农学学士学位。2002年毕业于西南农业大学食品学院, 获得工学硕士学位; 同年考入中国农业大学食品科学与营养工程学院攻读博士学位, 师从罗云波教授。

在学期间参加的研究项目:

2003年协助导师申请国家自然科学基金面上项目1项-运用VIGS技术研究番茄系统II乙烯的生产机理。项目编号: 30371004。参与该课题的研究工作。

博士在读期间发表论文:

1. Fu, D. Q., Zhu, B. Z., Zhu, H. L., Jiang, W. B. and Luo, Y. B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* (Published on line, June, 43:2 Cover)
2. Fu, D. Q., Zhu, B. Z., Zhu, H. L., Xie, Y. H., Zhang, H. X., Jiang, W. B. and Luo, Y. B. 2005. Improved Virus-induced gene silencing techniques as an alternative to stable transformation in tomato. *Plant Mol. Biol.* (in review)
3. Zhang, H. X., Zhu, B. Z., Yu, B. Y., Hao, Y. L., Fu, D. Q., Xu W. T. and Luo, Y. B. 2005 Cloning and DNA-binding properties of ethylene response factor, LeERF1 and LeERF2, in tomato. *Biotechnol. Lett.* 27 (6): 423-28
4. Zhu, H. L., Zhu, B. Z., Fu, D. Q., Xie, Y. H., Hao, Y. L. and Luo, Y. B. 2005. Role of Ethylene in the Biosynthetic Pathways of Aroma Volatiles in Ripening Fruit. *Russ. J. Plant Physiol.* (In press)
5. 傅达奇, 罗云波. 2005. 植物中病毒诱导基因沉默的研究进展. 中国生物工程杂志. 25, 62-66.
6. 傅达奇, 罗云波. 2005. 番茄中病毒诱导的基因沉默. 农业生物技术学报(接收)
7. 傅达奇, 罗云波. 2005. 烟草中病毒诱导的基因沉默. 西北植物学报(接收)

获奖情况:

荣获中国农业大学食品科学与营养工程学院2003-2004年度-爱普-二等奖学金。

作者: 傅达奇
学位授予单位: 中国农业大学
被引用次数: 2次

参考文献(172条)

1. [Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni JJ](#) [Signal transduction systems regulating fruit ripening](#)[外文期刊] 2004
2. [Aharoni A, O'Connell AP](#) [Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays](#) 2002
3. [Alexander L, Grierson D](#) [Ethylene biosynthesis and action in tomato:a model for climacteric fruit ripening](#) 2002
4. [Alexander L, Lin Z, Chen G](#) [Ethylene signaling in ripening tomato fruit](#) 2002
5. [Alkharouf NW, Matthews BF](#) [SGMD:the Soybean Genomics and Microarray Database](#) 2004
6. [Alonso JM, Hirayama T, Roman G](#) [EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis](#) 1999
7. [Angenent GC, Linthorst HJM, Belkum AF](#) [RNA2 of tobacco rattle virus strain TCM encodes an unexpected gene](#) 1986
8. [Balague C, Watson CF, Turner A J](#) [Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from Cucumis melo L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme](#) 1993
9. [Barry CS, Blume B, Bouzayen M](#) [Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato](#) 1996
10. [Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D](#) [The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato](#) 2000
11. [Baulcombe DC](#) [Fast forward genetics based on virus induced gene silencing](#) 1999
12. [Baulcombe DC](#) [RNA silencing in plants](#)[外文期刊] 2004
13. [Benedito VA, Visser PB, Angenent GC](#) [The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes](#) 2004
14. [Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM](#) [Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference](#) 2001
15. [Bilgin DD, Liu Y, Schiff M](#) [P58 \(IPK\), a plant ortholog of double-stranded RNA dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis](#) 2003
16. [Bleecker AB, Esch J J, Hall AE](#) [The ethylene-receptor family from Arabidopsis:structure and function](#) 1998
17. [Bleecker AB, Kende H](#) [Ethylene:a gaseous signal molecule in plants](#) 2000
18. [Bohmert K, Camus I, Bellini C](#) [AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development](#)[外文期刊] 1998
19. [Bramley PM](#) [Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development](#) 2002
20. [Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin H](#) [Virus-induced gene silencing in Solanum species](#) 2004
21. [Brigneti G, Voinnet O, Li W-X](#) [Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in Nicotiana benthamiana](#)[外文期刊] 1998
22. [Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB](#) [Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants](#) 2004
23. [Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A](#) [Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene](#)[外文期刊] 2000
24. [Chang C, Stewart RC](#) [The two-component system:regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes](#) 1998
25. [Chao QM, Rothenberg M, Solano R](#) [Activation of the ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins](#) 1997
26. [Chapman E J, Prokhnevsky AI, Gopinath K](#) [Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step](#) 2004
27. [Chen G, Alexander L, Grierson D](#) [Constitutive expression of EIL-like transcription factor partially restores ripening in the ethylene-insensitive Nr tomato mutant](#)[外文期刊] 2004
28. [Chen JC, Jiang CZ, Gookin TE](#) [Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence](#) 2004

29. [Chen X, Liu J, Cheng Y](#) [HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower](#) 2002
30. [Chung E, Seong E, Kim YC](#) [A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper \(*Capsicum annuum* L. cv. Bukang\)](#) 2004
31. [Ciardi J, Klee H](#) [Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor](#) 2001
32. [Clark KL, Larsen PB, Wang XX](#) [Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors](#)[外文期刊] 1998
33. [Cogoni C, Macino G](#) [Post-transcriptional gene silencing across kingdoms](#) 2000
34. [Cogoni C, Romano N, Macino G](#) [Suppression of gene expression by homologous transgenes](#) 1994
35. [Constantin GD, Krath BN, Macfarlane SA](#) [Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species](#) 2004
36. [Coupe SA, Deikman J](#) [Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes](#) 1997
37. [Dalmay T, Hamilton A, Rudd S](#) [An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus](#) 2000
38. [Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH](#) [SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis](#) 2001
39. [DellaPenna D, Lincoln JE, Fischer RL](#) [Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in Rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit](#) 1989
40. [Dinesh-Kumar SP, Anandalakshmi R, Marathe R](#) [Virus-induced gene silencing](#) 2003
41. [Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA](#) [Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing](#)[外文期刊] 2004
42. [Elmayan T, Balzergue S, Beon F](#) [Arabidopsis mutants impaired in cosuppression](#)[外文期刊] 1998
43. [Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K](#) [Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato](#)[外文期刊] 2004
44. [Fei Z, Tang X, Alba RM](#) [Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening](#) 2004
45. [Finnegan E J, Margis R, Waterhouse PM](#) [Post-transcriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY \(DICER-LIKE1\) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila](#) 2003
46. [Fire A, Xu SQ, Montgomery MK](#) [Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*](#) 1998
47. [Fitzmaurice WP, Holzberg S, Lindbo JA](#) [Epigenetic modification of plants with systemic RNA viruses](#) 2002
48. [Fofana IB, Sangare A, Collier R A](#) [A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava](#) 2004
49. [Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE](#) [application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids](#) 2000
50. [Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR](#) [Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development](#) 1994
51. [Giovannoni JJ](#) [Genetic regulation of fruit development and ripening](#)[外文期刊] 2004(zk)
52. [Giovannoni JJ](#) [MOLECULAR BIOLOGY OF FRUIT MATURATION AND RIPENING](#) 2001
53. [Golden TA, Schauer SE, Lang JD](#) [SHORT INTEGUMENTS1/ SUSPENSOR1/ CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in Arabidopsis](#) 2002
54. [Gossel V, Fache I, Meulewaeter F](#) [SVISS - a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants](#) 2002
55. [Gray J, Picton S, Shabbeer J](#) [Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes](#) 1992
56. [Gregory TW, Margaret GR, Jone GS](#) [A procedure for the small-scale isolation of plant suitable for RNA blot analysis](#)

57. [Griffiths A. Barry C. Alpuche-Solis AG Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening\[外文期刊\] 1999](#)
58. [Guo H. Ecker JR The ethylene signaling pathway:new insights 2004](#)
59. [Guo S. Kemphues KJ par-1, a gene required for establishing polarity in C.elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed 1995](#)
60. [Hackett RM. Ho CW. Lin ZF Antisense inhibition of the Nr gene restores normal ripening to the tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model 2000](#)
61. [Hall LN. Bird CR. Picton S Molecular characterisation of cDNA clones representing pectin esterase isozymes from tomato 1994](#)
62. [Hamilton A. Lycett GW. Grierson D Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants 1990](#)
63. [Hamilton A. Voinnet O. Chappell L. Baulcombe D Two classes of short interfering RNA in RNA silencing\[外文期刊\] 2002](#)
64. [Hamilton A J. Bouzayen M. Grierson D Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast 1991](#)
65. [Hamilton A J. Fray RG. Grierson D Sense and antisense inactivation of fruit ripening genes in tomato 1995](#)
66. [Hammond SM. Bernstein E. Beach D An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells 2000](#)
67. [Hammond SM. Boettcher S. Caudy AA Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi 2001](#)
68. [Hedden P. Phillips AL Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants\[外文期刊\] 2000](#)
69. [Herrera-Estrella L. Simpson J. Martinez-Trujillo M Transgenic plants:an historical perspective 2005](#)
70. [Holdsworth M J. Schuch W. Grierson D Organization and expression for a wound/ripening-related small multigene family from tomato 1988](#)
71. [Holzberg S. Brosio P. Gross C Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant 2002](#)
72. [Jin H. Axtell M J. Dahlbeck D NPK1, a MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants 2002](#)
73. [Jun SH. Han M J. Lee S OsEIN2 is a positive component in ethylene signaling in rice\[外文期刊\] 2004](#)
74. [Kende H Ethylene biosynthesis 1993](#)
75. [Kieber J J. Rothenberg M. Roman G CTR1, a negative regulator of the ethylene response way in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases 1993](#)
76. [Kim M. Yang KS. Kim YK Molecular characterization of NbPAF encoding the alpha6 subunit of the 20S proteasome in Nicotiana benthamiana 2003](#)
77. [Kjemtrup S. Sampson KS. Peele CG Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus 1998](#)
78. [Klee HJ Ripening physiology of fruit from transgenic tomato \(Lycopersicon esculentum\) plants with reduced ethylene synthesis 1993](#)
79. [Kumagai MH. Donson J. della-Cioppa G Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA 1995](#)
80. [Lanahan MB. Yen HC. Giovannoni J J The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato 1994](#)
81. [Langebartels C. Kerner K. Leonardi S Biochemical plant responses to ozone:differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco 1991](#)
82. [Lashbrook CC. Tieman DM. Klee HJ Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development 1998](#)
83. [Leclercq J. Adams-Phillips LC. Zegzouti H LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato 2002](#)
84. [Lee SS. Cho HS. Yoon GM Interaction of NtCDPK1 calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the](#)

85. Li WX, Ding SW Viral suppressors of RNA silencing 2001
86. Lichtenthaler HK Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes 1987
87. Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J Le-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis 1993
88. Lincoln JE, Cordes S, Read E Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development 1987
89. Lincoln JE, Fischer RL Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and rin tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) fruit 1988
90. Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance 1993
91. Liu Y, Nakayama N, Schiff M Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana* [外文期刊] 2004
92. Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP Virus-induced gene silencing in tomato 2002
93. Liu Y, Schiff M, Marathe R Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus 2002
94. Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers [外文期刊] 2000
95. Lu CG, Zainal Z, Tucker GA Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene 2001
96. Lucioli A, Noris E Tomato yellow leaf curl Sardinia virus rep-derived resistance to homologous
97. Lui Y, Hoffman NE, Yang SF Promotion by ethylene of the capacity to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruit 1985
98. MacFarlane SA, Popovich AH Efficient expression of foreign proteins in roots from tobamovirus vectors 2000
99. MacFarlane SA Molecular biology of the tobamoviruses 1999
100. Mallory AC, Ely L, Smith TH HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal 2001
101. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T Analysis of apiwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena* 2002
102. Moore S, Vrebalov J, Payton P Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato 2002
103. Mourrain P, Beclin C, Elmayan T Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance [外文期刊] 2000
104. Muangsan N, Robertson D Geminivirus vectors for transient gene silencing in plants 2004
105. Muller-Dieckmann H J, Grantz AA, Kim SH The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1 1999
106. Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H Differential expression and internal feedback regulation of AAC synthase, ACC oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening 1998
107. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans 1990
108. Nicholas F J, Smith CJS, Schuch W High-levels of ripening-specific reporter gene-expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions 1995
109. Nishikura K A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst [外文期刊] 2001

110. [Nykanen A, Haley B, Zamore P D](#) [ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway](#) [外文期刊] 2001
111. [Odile Faivre-Rampant2, Eleanor M](#) [Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves and Tubers of Potato](#) 2004
112. [Oeller PW, Wong LM, Taylor LP](#) [Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA](#) 1991
113. [Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY](#) [Differential induction of seven1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato\(Lycopersicon esculentum\)](#) 1997
114. [Olson DC, White JA, Edelman L](#) [Differential expression of two genes for1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits](#) 1991
115. [Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA](#) [RNAi related mechanisms affect both transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Drosophila](#) 2002
116. [Palmer KE, Rybicki EP](#) [Investigation of the potential of maize streak virus to act as an infectious gene vector in maize plants](#) 2001
117. [Park W, Li J, Song R](#) [CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, an HEN1, a novel protein, act in micro RNA metabolism in Arabidopsis thaliana](#) 2002
118. [Payton S, Fray RG, Brown S](#) [Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission](#) 1996
119. [Pear JR, Ridge N, Rasmussen R](#) [Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding clone from tomato](#) 1989
120. [Peart JR, Cook G, Feys BJ](#) [An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus](#) 2002
121. [Peele C, Jordan CV, Muangsan N](#) [Silencing of a meristem gene using geminivirus-derived vectors](#) 2001
122. [Pfeffer S](#) [Identification of virus-encoded microRNAs](#) [外文期刊] 2004
123. [Picton S, Barton SL, Bouzayen M](#) [Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene](#) 1993
124. [Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC](#) [Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing](#) 2001
125. [Raz V, Fluhr R](#) [Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants](#) 1993
126. [Richmond T, Somerville S](#) [Chasing the dream: plant EST microarrays](#) 2000
127. [Robertson D](#) [VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools](#) 2004
128. [Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE](#) [A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis](#) 1999
129. [Romeis T, Ludwig AA, Martin R](#) [Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response](#) [外文期刊] 2001
130. [Rose JKC, Lee HH, Bennett AB](#) [Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated](#) [外文期刊] 1997
131. [Rothstein S J, DiMaio J, Strand M](#) [Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA](#) 1987
132. [Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW](#) [1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence](#) 1991
133. [Rui Lu1, Isabelle Malcuit, Peter Moffett](#) [High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance](#) [外文期刊] 2003
134. [Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC](#) [Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing](#) 1998
135. [Ryu CM, Anand A, Kang L](#) [Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species](#) 2004
136. [Schiebel W, Pelissier T, Riedel L](#) [Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato](#) [外文期刊]

137. Shibuya K, Barry KG, Ciardi JA The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia[外文期刊] 2004
138. Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon 1998
139. Sitrit Y, Bennett AB Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination 1998
140. Solano R, Stepanova A, Chao QM Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 1998
141. Spanu P, Grosskopf DG, Felix G The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein-phosphorylation and dephosphorylation 1994
142. Spanu P, Reinhardt D, Boller T Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its messenger-RNA in *Xenopus laevis* oocytes 1991
143. Stearns JC, Glick BR Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception 2003
144. Tatsuki M, Mori H Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region 2001
145. Taverna SD, Coyne RS, Allis DC Methylation of histone H3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in *Tetrahymena*[外文期刊] 2002
146. Theologis A, Oeller PW, Wong LM Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process 1993
147. Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development 2001
148. Tieman DM, Klee HJ Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family[外文期刊] 1999
149. Tieman DV, Taylor MG, Ciardi JA The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family[外文期刊] 2000
150. Trentmann SM ERN1, a novel ethylene-regulated nuclear protein of *Arabidopsis* 2000
151. Turnage MA, Muangsang N, Peele CG Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis* 2002
152. Valentine T, Shaw J, Blok VC Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector 2004
153. Vogel JP, Woeste KE, Theologis A Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively 1998
154. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana glauca* 2000
155. Vrebalov J, Ruzinsky D, Padmanabhan V A MADS-box gene necessary for fruit ripening at tomato Ripening-inhibitor (Rin) locus 2002
156. Wang K, Li H, Ecker J Ethylene biosynthesis and signaling networks[外文期刊] 2002
157. Waterhouse PM, Wang M-B, Lough T Gene silencing as an adaptive defence against viruses 2001
158. Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants 2001(06)
159. Wilkinson J, Lanahan M, Yen H An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe[外文期刊] 1995
160. Wong WS, Ning W, Xu PL Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit 1999

161. [Xu RL, Goldman S, Coupe S Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative cis elements](#)[外文期刊] 1996
162. [Yamamoto M, Miki T, Ishiki Y The synthesis of ethylene in melon fruit during the early-stage of ripening](#) 1995
163. [Yang SF, Hoffman NE Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants](#) 1984
164. [Yip WK, Moore T, Yang SF Differential accumulation of transcripts for 4 tomatol-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions](#) 1992
165. [Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA RNAi:double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals](#) 2000
166. [Zarembinski TI, Theologis A Ethylene biosynthesis and action:a case of conservation](#) 1994
167. [Zegzouti H, Jones B, Frasse P Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit:characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display](#) 1999
168. [Zhou DB, Kalaitzis P, Mattoo AK The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues](#)[外文期刊] 1996
169. [Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation](#)[外文期刊] 2003
170. [傅达奇, 李正国 乙烯信号传导的研究进展](#)[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2002(5)
171. [傅达奇, 朱本忠, 罗云波 植物中病毒诱导基因沉默的研究进展](#) 2005(01)
172. [高俊凤 植物生理学实验技术](#)

本文读者也读过(7条)

1. [王宏芝 病毒诱导的基因沉默体系优化及烟草DHS基因功能研究](#)[学位论文]2005
2. [郭兴启, 朱常香, 宋云枝 RNA沉默与植物病毒](#)[期刊论文]-[生命科学](#)2002, 14(1)
3. [徐罡 黄瓜花叶病毒CB7分离物的RNA3基因功能分析](#)[学位论文]2008
4. [李媛 利用根部吸收法进行病毒诱导基因沉默的初步探索](#)[学位论文]2007
5. [左琦 利用病毒诱导的基因沉默技术探讨番茄PG与乙烯关系](#)[学位论文]2010
6. [张震霄 基于黄瓜花叶病毒的病毒诱导基因沉默载体构建](#)[学位论文]2009
7. [吕典秋, 吕文河, 李辉, LV Dianqiu, LV Wenhe, LI Hui 转录后基因沉默与植物对外界病毒的抵御](#)[期刊论文]-[东北农业大学学报](#) 2007, 38(5)

引证文献(2条)

1. [汪佳 番茄LeEIN2基因的克隆及其功能研究](#)[学位论文]硕士 2006
2. [汤春蕾 小麦叶片上潜伏期条锈菌的巢式PCR检测及小麦与条锈菌互作中相关激酶类基因的表达谱分析](#)[学位论文]硕士 2008

引用本文格式: [傅达奇 番茄中病毒诱导基因沉默体系的建立及LeEIN2基因功能分析](#)[学位论文]博士 2005