

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 非洲菊花瓣瞬时表达和病毒诱导的基因沉默(VIGS)系统的建立

唐宜<sup>1</sup>, 李凌飞<sup>1,2,\*</sup>, 王小菁<sup>1</sup><sup>1</sup>华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州510631; <sup>2</sup>深圳市中国科学院仙湖植物园, 深圳市亚热带植物多样性重点实验室, 广东深圳518004

**摘要:** 非洲菊(*Gerbera hybrida*)是重要的园艺观赏花卉,也是研究复杂花序进化与发育的模式植物。花瓣的生长对园艺观赏花卉品质的形成具有重要贡献,阐明花瓣生长的分子机理将有助于增加对植物器官形态建成的认识,并为花卉品质的改良提供理论依据。为了在非洲菊中更好地开展基因功能研究,建立有效的转化系统十分必要。本研究以非洲菊舌状花花瓣为材料,通过农杆菌真空渗透法,分别以 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因*GUS*和花色素苷合成关键转录因子基因*GMYB10*为报告基因,成功建立了花瓣瞬时表达及病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silence, VIGS)系统。该系统将为今后快速有效地开展非洲菊花瓣发育相关基因功能研究奠定技术基础。

**关键词:** 非洲菊; 花瓣; 瞬时基因表达系统; 病毒诱导的基因沉默

伴随着测序技术的进步,越来越多的植物基因组得以破译。以往的基础研究往往集中在少数模式物种上,但由于物种自身遗传背景的差异,很多生物学问题的最终阐明还需要回归到特定物种上,因此以传统的模式物种的相关研究也渐渐受到冲击。伴随基因组时代的到来,大量的基因功能需要鉴定。反向遗传学作为基因功能鉴定中最重要的手段之一,在过去的几十年已经得到广泛的应用(杨宇等2009)。而反向遗传学研究中最为关键的一步就是遗传转化。遗传转化即我们常提及的转基因技术,主要通过构建植物表达载体,通过适当手段导入植物基因组中,实现基因表达或沉默。由于建立稳定的遗传转化通常需要从外植体诱导开始,摸索与优化各种合适的转化条件,有时还会因物种的特殊性而举步维艰。因此,目前很多非模式植物的研究基本止步不前。

有效遗传转化体系是研究基因功能的重要工具,而稳定转化体系是常用的手段。然而对非模式植物而言,稳定转化体系依然存在周期长、转化效率低、操作繁杂等问题,其稳定遗传转化体系的建立依然是一大难题(王磊等2014)。与稳定转化相比,瞬时表达技术具有简单快速、表达水平高、遗传转化时间短等优点,因此近年来被广泛应用于植物基因功能研究中。研究表明,将带有CaMV 35S启动子连接目的基因的质粒的农杆菌注射入烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片中,几天后就能检测到基因的表达(文莉薇和朱鸿亮2015)。

在一些非模式植物如莴苣(*Lactuca sativa*)、桦树(*Betula platyphylla*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、可可树(*Theobroma cacao*)等中也逐步建立了相应的瞬时表达系统(李静等2006; Santos-Rosa等2008; 周蓓蓓等2010; Zhang等2012b; Carvalho等2016)。

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silence, VIGS)是近年来逐渐流行起来的一种基因瞬时沉默技术,该技术是一种RNA干扰(RNAi)介导的抗病毒防御反应机制,属于转录后的基因沉默,它利用人工改造病毒载体,在载体上连上植物自身目的基因,以假乱真,引起植物通过形成小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)降解自身的mRNA,从而抑制了植物内源基因的表达(Godge等2008)。目前该技术除了被用于烟草和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等模式植物上(Nethra等2006; Cai等2006)之外,在诸多非模式物种如月季(*Rosa chinensis*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、大豆(*Glycine max*)、小麦(*Triticum aestivum*)中亦得到广泛应用(Faivre-Rampant等2004; Godge等2008; Lü等2014)。Deng等(2012)以幼苗和花序为材料,利用传统的八氢番茄红素合成酶基因(*PDS*)及花色素苷合成途径关键结构基因查尔酮合成酶基因(*CHS*)为报告基因,在非洲菊中也建立了相应的VIGS系统。

收稿 2017-01-04 修定 2017-02-16

资助 国家自然科学基金(31372099和31601784)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20104407110005)和广东省自然科学基金重点项目(9251063101000002)。

\* 通讯作者(E-mail: lingfei\_li@m.scnu.edu.cn)。

非洲菊为菊科(Asteraceae)大丁草属多年生宿根草本花卉,因其花朵硕大、花枝挺拔、花型优美、花色艳丽等优点已成为世界五大切花之一(冯会和潘东明2010)。非洲菊头状花序上拥有舌状花、过渡花和盘状花3种不同类型的小花,是研究花瓣形态建成的理想材料,目前在国际上已经被作为研究复杂花序进化与发育的模式植物(Broholm等2010; Zhang等2012a; Kuang等2013)。花器官是观赏花卉最重要组成部分,而花瓣作为花器官的主要组成部分之一,花瓣的大小、形状、数目及色彩决定了花卉的品质。对花瓣生长的分子机理进行阐述将有助于增加对植物花器官形态建成的认识,并为花卉品质改良提供理论依据。本研究以金黄色非洲菊(*Gerbera hybrida*)品种‘深圳5号’(‘S5’)的舌状花花瓣为材料,通过农杆菌真空渗透法,利用葡萄糖苷酸酶( $\beta$ -glucuronidase)基因*GUS*作为报告基因,建立非洲菊花瓣瞬时表达系统,并在此基础上利用花色苷合成途径关键转录因子基因*GMYB10*建立了非洲菊花瓣VIGS系统。该系统将为更好地研究非洲菊花瓣发育分子机理提供重要的技术,同时也为其他植物相关的研究提供一定的借鉴。

## 材料与方法

### 1 实验材料

植物材料为金黄色非洲菊(*Gerbera hybrida*)品种‘深圳5号’(‘S5’),生长在广州市增城区镇龙鲜花种植基地的温室中,昼温24~28°C,夜温16~20°C,相对湿度65%~80%,自然光照。实验选用3期舌状花花瓣进行,花发育时期的划分及花瓣离体培养参照本实验建立的系统(Meng和Wang 2004; Huang等2008; Zhang等2012a; Li等2015)进行。

VIGS载体pTRV1与pTRV2由清华大学刘玉乐教授惠赠,植物超表达载体pCanG与带*GUS*片段的pBI101载体由本实验室自存。农杆菌菌种C58C1由山东农业大学李向东教授惠赠。

### 2 载体构建

#### 2.1 超表达载体构建

以表达载体pBI101质粒为模板,用PrimerSTAR HS酶(上海宝生物有限公司)通过特异引物(表1)扩增得到*GUS*基因,连接PMD19-T载体(上海宝生物有限公司),质粒经*Bam*HI/*Spe*I双酶切后连接到

pCanG表达载体上,得到pCanG-GUS表达载体,由CaMV 35S强启动子驱动*GUS*表达。

#### 2.2 VIGS载体构建

以非洲菊舌状花花瓣cDNA为模板,用PrimerSTAR HS酶通过特异引物(表1)扩增得到长度为518 bp的*GMYB10*基因,随后连接到PMD19-T载体上,质粒经*Eoc*RI/*Bam*HI双酶切后,将*GMYB10*连接到pTRV2表达载体上。经验证后构建成功的载体,分别转入农杆菌C58C1感受态细胞中备用。

### 3 非洲菊花瓣瞬时表达系统建立

挑选10个以上长势基本一致、发育至3期的非洲菊花序,剥取其外轮舌状花花瓣,将花瓣分为整花瓣及切段两种进行后续处理,花瓣切段采用自制的刀片工具从花瓣中部切取等长的一段(约7 mm)用于后续侵染实验。将过夜培养的分别带有pCanG空载体及pCanG-GUS载体的农杆菌菌液于4°C条件下4 000×g离心10 min后,用侵染液(10 mmol·L<sup>-1</sup> 2-吗啉乙磺酸+40 mg·L<sup>-1</sup>乙酰丁香酮+10 mmol·L<sup>-1</sup>氯化镁, pH 5.6)悬浮农杆菌,悬浮后使菌液浓度达OD<sub>600</sub>=0.8~1.0。将新鲜非洲菊花瓣材料,随机分成若干等份(每份20个以上作为一个处理),用纱布包裹后分别浸没在不同农杆菌混合侵染液中,以侵染空载体的作为对照(Mock),将各处理同时置于气压为-0.10~-0.09 MPa条件下,负压处理5~6 min,随后慢慢恢复正常大气压(过程约为2 min);将各组材料取出先用自来水轻轻冲洗干净,然后蒸馏水润洗3次后,分别置于垫有无菌滤纸并已加入5 mL无菌双蒸水的无菌培养皿(直径为9 cm)中,8°C条件下黑暗培养3 d。以取出后开始计为0 d,参照本实验室建立的非洲菊离体培养体系进行培养(Zhang等2012a; Li等2015):将黑暗培养3 d后的花瓣材料放置光下,25°C培养9 d,每隔3 d更换无菌双蒸水、无菌滤纸和培养皿,每天补加无菌500 μL双蒸水,定期取材进行GUS染色分析。

### 4 非洲菊花瓣VIGS系统建立

VIGS操作方法参照瞬时转化系统进行,将过夜培养的带有pTRV1、pTRV2空载体及连接有*GMYB10*基因的pTRV2 (pTRV2-GMYB10)农杆菌菌液于4°C条件下4 000×g离心10 min后,用上述的侵染液悬浮农杆菌,悬浮后使菌液浓度达OD<sub>600</sub>=1.5~2.0,并保证各组浓度相近。将含有pTRV1农杆菌的侵染液与分别含有pTRV2及pTRV2-GMYB10农杆菌的侵染

表1 非洲菊花瓣瞬时表达及VIGS实验相关引物

Table 1 Primers for transient gene expression and VIGS system in *G. hybrida* petals

引物名称	引物序列(5'→3')	实验用途
GMYB10-VIGS-F	GCGAATTCAGTTGTAGGCTGAGATGGTT	载体构建
GMYB10-VIGS-R	GCGGATCCTCGTCTGCTGGAGTAAATG	载体构建
GUS-pCanG F	CTCGAGATGTTACGTCCTGTAGAAAACC	载体构建
GUS-pCanG R	GGTACCCTTGTTTGCCTCCCTGCT	载体构建
GMYB10-Semi-F	GTTCAGGGCTGAGGAAAGGT	RT-PCR
GMYB10-Semi-R	GCTTTGCCTGTTACCGAACCC	RT-PCR
GDFR1-Semi-F	ACTGCACGTGTACGACGAAT	RT-PCR
GDFR1-Semi-R	ATCGATCCCCGAAACTTGG	RT-PCR
GF3'H-Semi-F	GATTTGTGTCGGAATGAGCCT	RT-PCR
GF3'H-Semi-R	CTTGGGTGAACCACTAACCG	RT-PCR
GANS-Semi-F	CGGACTCCATCATCTTACACATT	RT-PCR
GANS-Semi-R	TAGTTTTGCATCACTTCGCTTTAT	RT-PCR
GActin-Semi-F	ACGGGAAATCGTTCGTGACA	RT-PCR
GActin-Semi-R	GACCCACCACTCAGCACAAATG	RT-PCR
TRV1-F	TTACAGGTTATTTGGGCTAG	RT-PCR
TRV1-R	CCGGTTCAATTCCTTATC	RT-PCR
TRV2-F	TGGGAGATGATACGCTGTT	RT-PCR
TRV2-R	CCTAAACTTCAGACACG	RT-PCR

液按照体积比为1:1进行混合, 室温下黑暗放置4~6 h。后续侵染过程与瞬时表达系统相同, 每天对花瓣材料进行跟踪拍照记录, 9 d后进行取材实验。

### 5 基因表达水平检测

非洲菊花瓣处理培养9 d后取材, 按照RNA提取试剂盒(华越洋生物科技有限公司)提取获得去除基因组DNA的总RNA, 选择随机六核苷酸引物(random 6 mers)用TaKaRa反转录试剂盒(上海宝生物有限公司)进行反转录, 获得cDNA作为模板, 采用半定量进行各基因表达水平检测, 借助Image J软件对表达量进行量化。各基因的引物序列见表1。

### 6 GUS组织化学染色

参考Jefferson等(1987)的方法, 选取培养不同天数的转化Mock或pCanG-GUS的非洲菊花瓣, 每组20个以上, 分别置于1.5 mL离心管中, 加入GUS染液至浸没, 37°C反应18~24 h, 按照30%、50%、75%、90%浓度梯度的乙醇进行脱色, 然后从高浓度到低浓度梯度复水。染色后的花瓣在解剖镜下进行拍照观察, 并借助Olympus显微镜(Olympus公司)对花瓣局部GUS进行观察。

### 7 花色苷含量检测

参照Meng和Wang (2004)的提取方法, 称取50 mg非洲菊花瓣置于1 mL花色苷浸提液中(1%盐

酸甲醇溶液), 4°C抽提过夜。室温下8 000×g离心2 min, 取上清液, 用UV-1206分光光度计(日本Shimadzu公司)测定530和657 nm处的吸收光值。通过公式 $\Delta A = A_{530} - 1/4A_{657}$ , 计算出花色苷的相对含量。

### 8 数据分析

非洲菊花瓣瞬时转化及VIGS实验至少重复3次以上, 花色苷含量水平为3次生物学重复的平均值。差异水平检测采用SPSS 13.0软件One-way ANOVO方法进行。

## 实验结果

### 1 非洲菊花瓣瞬时表达系统的建立

*GUS*基因因其具有高灵敏度及易于实验观测等优点, 被广泛用作转基因植物的报告基因(牛东东等2014)。为了在非洲菊花瓣中建立瞬时表达系统, 以超表达载体pCanG为骨架, 通过酶切连接在CaMV 35S启动子后插入了*GUS*基因, 成功构建获得了pCanG-GUS超表达载体(图1-A)。经前期摸索, 最终选择发育3期的舌状花花瓣作为材料进行后续的实验。实验分别选取完整的及切段的花瓣作为材料, 经真空渗透法进行农杆菌侵染后, 分别对培养3、5、7和9 d后的非洲菊花瓣进行取材, 并通过GUS染色分析转化情况。结果表明, 与转化



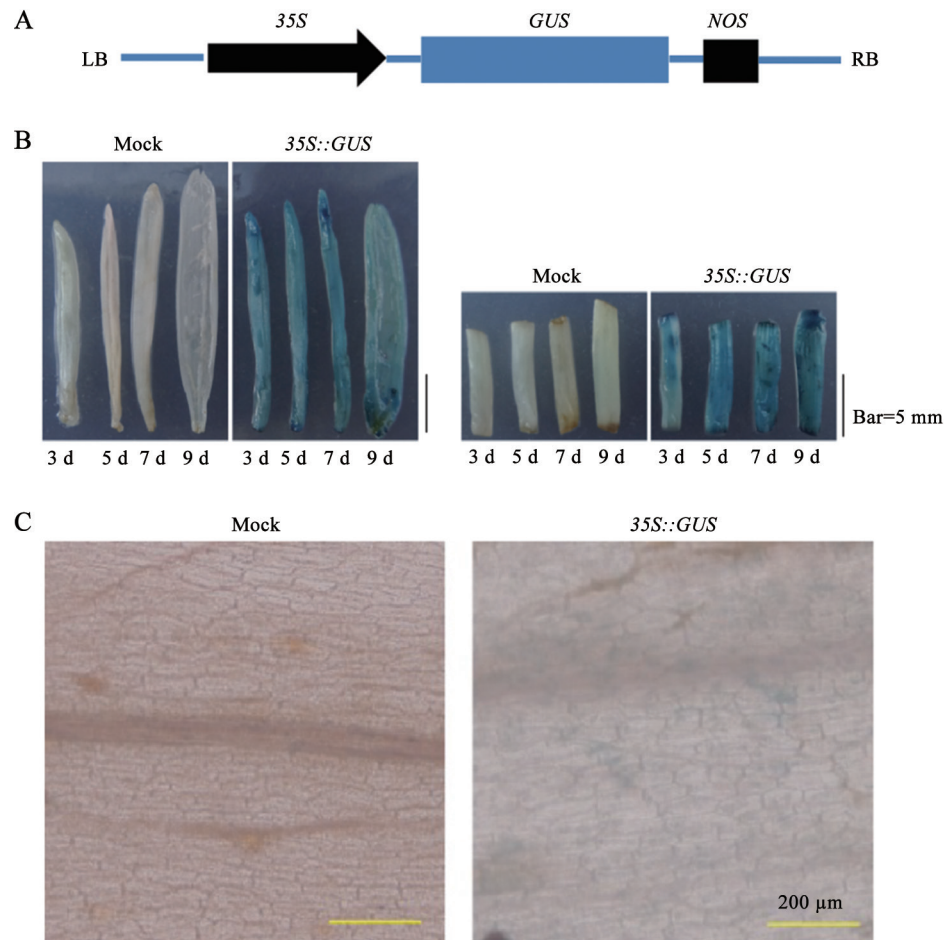


图1 非洲菊花瓣瞬时表达系统的建立

Fig.1 Establishment of transient gene expression system in *G. hybrida* petals

A: 35S::GUS载体构建示意图。B: 瞬时转化非洲菊花瓣的GUS染色, 左为完整的花瓣, 右为切段的花瓣, 标尺=5 mm。C: 显微观察瞬时转化非洲菊花瓣细胞GUS染色情况, 标尺=200  $\mu\text{m}$ 。

空载体Mock的相比, 不论是在整个花瓣还是切段花瓣中, 瞬时转化有35S::GUS的花瓣中, 经GUS染色3 d后蓝色遍布整个花瓣(图1-B)。显微观察显示, 转化35S::GUS的花瓣表皮细胞中也呈现出蓝色(图1-C)。以上的结果说明, 通过真空渗透法建立的非洲菊花瓣瞬时转化是可行的, 而花瓣切断与否不影响转化效果。

## 2 非洲菊花瓣VIGS系统的建立

由R2R3-MYB、bHLH及WD40三类转录因子组成的三元复合体MBW (MYB-bHLH-WD40)在花色苷合成方面起着关键的调控作用(Xu等2015)。研究发现, 在非洲菊中, MYB类转录因子GMYB10通过与bHLH类转录因子GMYBC1相互作用后直接调控下游花色苷合成关键结构基因GDFR的表

达, 进而促进非洲菊花瓣的花色素苷合成(Elomaa等2003; Laitinen等2008)。为了建立直观的非洲菊花瓣VIGS系统, 本实验中选用了非洲菊GMYB10基因作为报告基因进行沉默后的表型分析。将pTRV2-GMYB10通过真空渗透法侵染非洲菊花瓣, 经9 d培养后发现, 转化pTRV2-GMYB10的花瓣颜色明显比对照(Mock)浅(图2-A)。定量测定结果显示, 与转化了空载体的对照(Mock)相比, 转化GMYB10花色苷的含量显著降低(图2-B)。

为检验烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)上T-DNA是否插入花瓣基因组并表达, 进一步根据pTRV1与pTRV2上的序列分别设计载体特异引物, 其中pTRV1载体的引物设计在RdRP (RNA依赖RNA聚合酶)元件上, pTRV2载体的引物设计在多

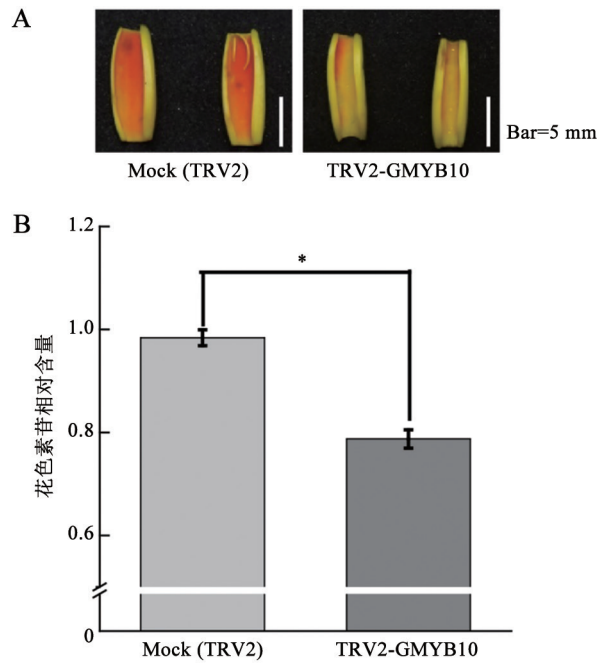


图2 VIGS沉默*GMYB10*抑制花色苷合成  
Fig.2 Silenced *GMYB10* by VIGS suppressed anthocyanin biosynthesis

A: 瞬时沉默*GMYB10*对非洲菊花瓣着色的影响; B: 瞬时沉默*GMYB10*对花色苷含量的影响。花色苷相对含量以未转化的花瓣含量设为1, 实验结果为3次生物学重复的平均值 $\pm$ SE, 每组花瓣处理个数为20以上。

克隆位点的两端, pTRV1与pTRV2载体如果成功插入并表达, PCR产物大小理论上为647与281 bp (图3-A)。将培养9 d后的空白对照(未经任何转化处理)、Mock及pCanG-*GMYB10*转化的花瓣提取RNA并反转录成cDNA后, 利用pTRV1与pTRV2载体上的两对引物分别对各处理组进行扩增, 结果显示, 不管是在Mock, 还是在pTRV2-*GMYB10*转化的花瓣中, 都能检测到TRV1与TRV2载体相应片段, 并且在TRV2-*GMYB10*的花瓣cDNA中检测到的片段大小为769 bp, 也与预期相符(图3-B), 表明pTRV1与pTRV2的T-DNA片段已经整合进入花瓣基因组并得到表达。为进一步确认*GMYB10*基因是否沉默, 根据*GMYB10*基因序列设计半定量引物。引物设计避开了用于构建pTRV2-*GMYB10*所用区域, 使用该引物对*GMYB10*基因在各处理中的表达水平进行检测后发现, *GMYB10*在TRV2-*GMYB10*转化的花瓣中显著下调, 其中TRV2-*GMYB10*转化的花瓣*GMYB10*表达量是对照中的35%, 是Mock中的40% (图3-C)。同时, 其下游的一些结构基因, 包括*GDFR1*、*GF3'H*基因的表达水平也受到一定抑制(图3-B和C)。上述结果表明, 本研究建立的非洲菊瞬时沉默系统已经构建成功。

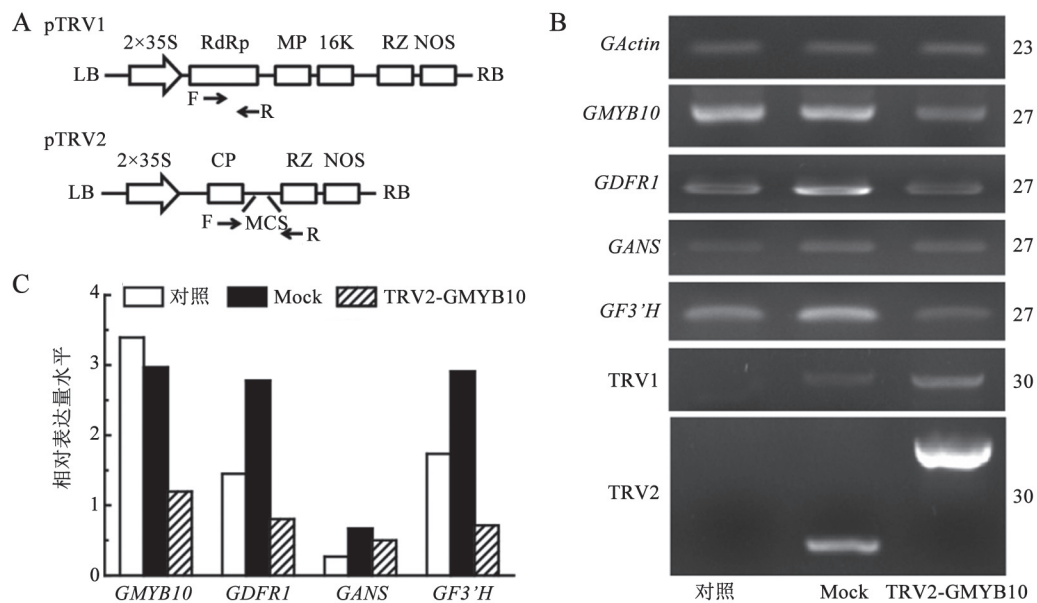


图3 沉默*GMYB10*后花色苷合成途径相关结构基因表达量鉴定

Fig.3 Expression of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis after silencing *GMYB10*

A: pTRV1与pTRV2载体及引物设计示意图; B: 半定量RT-PCR检测*GMYB10*沉默花瓣中*GMYB10*基因, 花色苷合成途径中结构基因*GDFR1*、*GANS*、*GF3'H*以及pTRV1与pTRV2载体T-DNA在花瓣中的表达情况, 右边数字为PCR循环数; C: 半定量RT-PCR量化结果。

## 讨 论

目前,大多数基因功能的鉴定主要通过突变体表型的分析(Lou等2014)和稳定遗传转化(Pattanaiik等2010)等途径实现。然而,对于一些非模式植物而言,稳定遗传转化就显得非常局限,存在耗时长、程序繁杂、转化效率低、嵌合体株率高等缺点(Kirienko等2012; Lu等2013)。近年来,随着瞬时转化尤其是VIGS技术在不同植物中的广泛应用,促使研究现状有了较大的改观。在非洲菊中,尽管前期已建立了稳定的遗传转化,但依然存在转化效率低、嵌合体多等因素阻碍了研究的进一步深入,芬兰赫尔辛基大学Paula Elomaa实验室建立的转化系统,转化效率仅为0.1% (芬兰赫尔辛基大学Paula Elomaa教授私人通信),而本实验建立的以单芽为外植体的稳定转化系统,转化效率约为7% (张妙彬2005),但却存在嵌合体植株率高等问题,实际应用仍然困难,因此,在非洲菊中建立有效的瞬时转化系统依然十分必要。

已有研究表明,利用TRV为载体在非洲菊幼苗与花序中进行基因瞬时沉默具有一定的可行性。如果选用常规的去针头注射方式,通常转化成功率只在50%以下,并且不同品种之间差异较大;真空渗透法能显著提高转化率,但对处理幼苗来说存在很多的局限性,如真空设备的要求及一次处理样本的数目都受到一定的限制(Deng等2012)。花瓣作为观赏花卉重要的组分之一,其形态建成对于园艺品质的形成具有重要意义,也是园艺学家关注的焦点之一;而作为典型的菊科植物,非洲菊头状花序具有成百上千个小花,数目众多的小花为研究花发育提供了很好的材料(Teeri等2006)。此外,由于非洲菊花瓣细胞结构简单,花瓣细胞生长遵循先分裂后扩张的模式,因此也被作为研究器官形态建成的良好系统(Laitinen等2007; Li等2015)。本研究以非洲菊‘S5’花瓣为材料,有效地利用花瓣数目优势,借助真空渗透法,建立了瞬时转化系统。经多次生物学重复实验,表明转化效率达到100%,这之前建立的转化系统相比,大大提高了效率,这将为后续的研究尤其是花瓣发育分子机理的阐明提供良好的技术基础。

发育时期的选择是影响包括VIGS在内的瞬时转化成功率的最重要因素之一。一般情况下,

选择发育阶段较早的材料效果更好(Liu等2002; Deng等2012)。在前期实验摸索阶段,我们尝试用发育1~4期的花瓣进行转化,发现均能检测到T-DNA片段的成功插入(结果未显示),但由于1期的花瓣过小,离体培养时容易导致花瓣发育畸形,而3期之后的花瓣则由于已经着色,因此均不利于表型观察。对于非洲菊花瓣而言,3期处于比较特殊的阶段,该时期既是花瓣细胞由分裂向扩张的转变,又是花色转变的关键阶段(Laitinen等2007; Li等2015),因此后续实验我们均以3期花瓣作为材料来建立瞬时转化系统,并取得了良好的效果。尽管如此,后续如果需要针对一些特殊的生物学过程开展研究,如花瓣衰老,则需要选择更合适的时期进行处理,而本研究建立的系统亦可作为参考。研究表明,切口创伤有助于T-DNA在受体植物细胞中转移(Liu等2002)。本研究选用完整及切段两种方式进行实验,发现两者不存在差异,由此说明,用真空渗透法对花瓣进行处理可以确保转化成功率。

优良的报告基因是评价VIGS系统沉默效果的有效工具,影响植物颜色的基因常常被用作报告基因,目前,*PDS*、*CHS*及绿色荧光蛋白基因(*GFP*)是常用的报告基因(李小龙等2014)。为建立非洲菊可视化的VIGS系统,我们选择了*GMYB10*作为报告基因,该基因编码一个MYB类转录因子,通过促进下游结构基因的表达从而促进花色素苷的合成(Elomaa等2003; Laitinen等2008),影响花色的形成。本研究结果表明,沉默*GMYB10*后确实能抑制花瓣花色素苷的形成(图2-A和B),并且其下游结构基因*GDFR1*、*GANS*和*GF3'H*的表达也被抑制,说明以*GMYB10*基因作为报告基因具有可行性,将来亦可用于构建其他物种的瞬时转化系统。

综上,本研究在非洲菊花瓣中成功建立的瞬时转化及VIGS系统将为非洲菊花瓣基因功能研究提供更方便、快捷的途径,也为其他非模式物种开展相关研究提供思路与借鉴。

## 参考文献

- Broholm SK, Pollanen E, Ruokolainen S, Tahtiharju S, Kotilainen M, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH (2010). Functional characterization of B class MADS-box transcription factors in *Gerbera hybrida*. *J Exp Bot*, 61 (1): 75-85
- Cai XZ, Xu QF, Wang CC, Zheng Z (2006). Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the *RPS2*-dependent resistance signalling pathways in *Arabidopsis*.



- Plant Mol Biol, 62 (1-2): 223–232
- Carvalho RF, Carvalho SD, O'Grady K, Folta KM (2016). Agroinfiltration of strawberry fruit—a powerful transient expression system for gene validation. *Curr Plant Biol*, 6: 19–37
- Deng X, Elomaa P, Nguyen CX, Hytonen T, Valkonen JP, Teeri TH (2012). Virus-induced gene silencing for Asteraceae—a reverse genetics approach for functional genomics in *Gerbera hybrida*. *Plant Biotechnol J*, 10 (8): 970–978
- Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert VA, Laitinen RA, Teeri TH (2003). Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Physiol*, 133 (4): 1831–1842
- Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiol*, 134 (4): 1308–1316
- Feng H, Pan D (2010). Influence of post-harvest physiology of *Gerbera* in different temperature conditions with different concentrations of GA<sub>3</sub> in preservation. *Northern Hortic*, (5): 173–175 (in Chinese with English abstract) [冯会, 潘东明(2010). 不同温度下GA<sub>3</sub>对非洲菊采后生理效应的影响. *北方园艺*, (5): 173–175]
- Godge MR, Purkayastha A, Dasgupta I, Kumar PP (2008). Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Rep*, 27 (2): 209–219
- Huang Z, Liang M, Peng J, Xing T, Wang X (2008). Exogenous ammonium inhibits petal pigmentation and expansion in *Gerbera hybrida*. *Physiol Plant*, 133 (2): 254–265
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MM (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6 (13): 3901–3907
- Kirienko DR, Luo A, Sylvester AW (2012). Reliable transient transformation of intact maize leaf cells for functional genomics and experimental study. *Plant Physiol*, 159 (4): 1309–1318
- Kuang Q, Li L, Peng J, Sun S, Wang X (2013). Transcriptome analysis of *Gerbera hybrida* ray florets: putative genes associated with gibberellin metabolism and signal transduction. *PLoS ONE*, 8 (3): e57715
- Laitinen RA, Pollanen E, Teeri TH, Elomaa P, Kotilainen M (2007). Transcriptional analysis of petal organogenesis in *Gerbera hybrida*. *Planta*, 226 (2): 347–360
- Laitinen RAE, Ainasoja M, Broholm SK, Teeri TH, Elomaa P (2008). Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J Exp Bot*, 59 (13): 3691–3703
- Li J, Chen M, Liu X, Shen F, Wang P (2006). A highly efficient system establishment of transient expression in lettuce. *Acta Hortic Sin*, 33 (2): 405–407 (in Chinese with English abstract) [李静, 陈敏, 刘现伟, 沈法富, 王鹏(2006). 莴苣高效瞬时超表达系统的建立. *园艺学报*, 33 (2): 405–407]
- Li L, Zhang W, Zhang L, Li N, Peng J, Wang Y, Zhong C, Yang Y, Sun S, Liang S, et al (2015). Transcriptomic insights into antagonistic effects of gibberellin and abscisic acid on petal growth in *Gerbera hybrida*. *Front Plant Sci*, 6: 168
- Li X, Xie L, Jiao J, Wei S, He Y, Yan H, Xu B (2014). The application progress of VIGS technology in gene function research. *Genomics Appl Biol*, 33 (6): 1401–1404 (in Chinese with English abstract) [李小龙, 谢伶俐, 焦靖芝, 魏淑东, 何勇, 严寒, 许本波(2014). VIGS技术在基因功能研究中的应用进展. *基因组学与应用生物学*, 33 (6): 1401–1404]
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002). Tobacco *Rar1*, *EDSI* and *NPRI/NIMI* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30 (4): 415–429
- Lou Y, Xu XF, Zhu J, Gu JN, Blackmore S, Yang ZN (2014). The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall. *Nat Commun*, 5: 3855
- Lü PT, Zhang CQ, Liu JT, Liu XW, Jiang GM, Jiang XQ, Khan MA, Wang LS, Hong B, Gao JP (2014). RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (*Rosa hybrida*) petal senescence. *Plant J*, 78 (4): 578–590
- Lu Y, Chen X, Wu Y, Wang Y, He Y, Wu Y (2013). Directly transforming PCR-amplified DNA fragments into plant cells is a versatile system that facilitates the transient expression assay. *PLoS ONE*, 8 (2): e57171
- Meng XC, Wang XJ (2004). Regulation of flower development and anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. *J Hortic Sci Biotech*, 79 (1): 131–137
- Nethra P, Nataraja KN, Rama N, Udayakumar M (2006). Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector. *Curr Sci India*, 90 (3): 431–435
- Niu D, Hao Y, Rong R, Wei H, Lan J, Shi J, Wei J, Li X, Yang S, Xi W, et al (2014). Detection of GUS protein and its expression pattern in transgenic rice plants. *Sci Agric Sin*, 47 (14): 2715–2722 (in Chinese with English abstract) [牛东东, 郝育杰, 荣瑞娟, 韦汉福, 兰金萃, 史佳楠, 魏健, 李雪姣, 杨烁, 奚文辉等(2014). 转基因水稻中GUS蛋白质的检测及其表达特征. *中国农业科学*, 47 (14): 2715–2722]
- Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D, Werkman JR, Xie CH, Patra B, Yuan L (2010). Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta*, 231 (5): 1061–1076
- Santos-Rosa M, Poutaraud A, Merdinoglu D, Mestre P (2008). Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Rep*, 27 (6): 1053–1063
- Teeri TH, Elomaa P, Kotilainen M, Albert VA (2006). Mining plant diversity: *Gerbera* as a model system for plant developmental and biosynthetic research. *BioEssays*, 28 (7): 756–767
- Wang L, Chen W, Liu Y, Yang R, Ying X, Ma N, Gao J (2014). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system and its utilization in RNAi based gene silencing of rose (*Rosa hybrida*) petals. *J Agric Biotechnol*, 22 (2): 133–140 (in Chinese with English abstract) [王磊, 陈雯, 刘娅, 杨若韵, 阴霞, 马男, 高俊平(2014). 月季花瓣中农杆菌介导的基因瞬时表达体系的优化及其在RNAi中的应用. *农业生物技术学报*, 22 (2): 133–140]
- Wen L, Zhu H (2015). Establishment and optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system in tobacco. *Bot*

- Res, 4 (2): 25–31 (in Chinese with English abstract) [文莉薇, 朱鸿亮(2015). 烟草基因瞬时表达系统的建立与优化研究. 植物学研究, 4 (2): 25–31]
- Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci*, 20 (3): 176–185.
- Yang Y, Wang D, Li H (2009). Application of reverse genetics in modern biology. *Biotechnol Bull*, (5): 43–45 (in Chinese with English abstract) [杨宇, 王丹, 李浩戈(2009). 反向遗传学在现代生物学领域中的应用. 生物技术通报, (5): 43–45]
- Zhang L, Li L, Wu J, Peng J, Zhang L, Wang X (2012a). Cell expansion and microtubule behavior in ray floret petals of *Gerbera hybrida*: responses to light and gibberellic acid. *Photochem Photobiol Sci*, 11 (2): 279–288
- Zhang MB (2005). Establishment and optimization of regeneration and transformation systems of *Gerbera hybrida* [Master's thesis]. Guangzhou: South China Normal University (in Chinese with English abstract) [张妙彬(2005). 非洲菊(*Gerbera hybrida*)再生和转化体系的建立和优化[硕士论文]. 广州: 华南师范大学]
- Zhang Y, Wang Y, Wang C (2012b). Gene overexpression and gene silencing in birch using an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Mol Biol Rep*, 39 (5): 5537–5541
- Zhou P, Chen Y, Zhang Z, Tao J (2010). Effect of sonication-assisted-*Agrobacterium*-mediated genetic transformation on instantaneous expression of GUS in grape variety “Meirenzhi”. *Acta Agric Jiangxi*, 22 (4): 6–8 (in Chinese with English abstract) [周蓓蓓, 陈月红, 章镇, 陶建敏(2010). 超声波辅助对农杆菌介导“美人指”葡萄遗传转化中GUS瞬时表达的影响. 江西农业学报, 22 (4): 6–8]

## Establishment of transient gene expression and virus-induced gene silencing (VIGS) system in *Gerbera hybrida* petals

TANG Yi<sup>1</sup>, LI Ling-Fei<sup>1,2,\*</sup>, WANG Xiao-Jing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Southern Subtropical Plant Diversity, Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen & Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518004, China

**Abstract:** *Gerbera hybrida* is an important ornamental flower, and also an ideal model system for studying development and evolution mechanism of complex inflorescences. Petal growth is pivotal for ornamental flowers morphogenesis. Clarifying the genetic networks of petal morphogenesis will contribute to understand the organogenesis as well as provide new theoretical basis for ornamental plant breeding. Thus, it is necessary to establish an effective transformation system for in-depth identification of gene function in *G. hybrida*. In this study,  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) and *GMYB10* (key gene for anthocyanin biosynthesis in *Gerbera* petal) were selected as reporter genes to establish transient gene expression and virus-induced gene silencing (VIGS) system in *Gerbera* ray petals. Using *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration method, high-efficiency transformation systems had been successfully established. This study will provide an effective tool for gene function analysis in *G. hybrida* petals.

**Key words:** *Gerbera hybrida*; petal; transient gene expression system; virus-induced gene silencing

Received 2017-01-04 Accepted 2017-02-16

This work was supported by National Natural Science Foundation of China Grants (Grant Nos. 31372099 and 31601784), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (Grant No. 20104407110005) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No. 9251063101000002).

\*Corresponding author (E-mail: lingfei\_li@m.scnu.edu.cn).