

引文格式: 张鑫, 桂敏, 刘弟, 等. 辣椒 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因沉默的表型比较[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 125–131. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202304032](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202304032)

辣椒 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因沉默的表型比较*

张鑫¹, 桂敏^{1,2}, 刘弟³, 张金峰⁴, 刘雅婷^{3**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院 园艺作物研究所, 云南 昆明 650205;
3. 云南农业大学 烟草学院, 云南 昆明 650201; 4. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 【目的】沉默辣椒 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因, 比较分析两者白化表型的差异, 寻找新的辣椒沉默标记基因。【方法】利用双酶切克隆技术构建 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的沉默载体; 通过农杆菌介导转化感染辣椒, 观察辣椒的沉默表型; 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的沉默效率。【结果】农杆菌浸润 21 d 后, 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒叶片出现褪绿症状, 沉默 *CaPDS* 基因的辣椒叶片出现白化。农杆菌浸润 30 d 后, 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒叶片出现较为明显的白化; 沉默 *CaPDS* 基因的辣椒叶片白化程度加剧, 新叶近乎白化。与 *CaDXS* 基因相比, 沉默 *CaPDS* 基因导致的辣椒白化表型更明显和高效。沉默组辣椒叶片中 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的表达量均显著降低 ($P<0.05$), 沉默效率分别为 86.80% 和 93.08%, 表明辣椒 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因被成功沉默。【结论】*CaDXS* 基因可以作为辣椒的沉默标记基因, 但沉默 *CaPDS* 基因的辣椒白化表型出现更早且明显, 因此, *CaPDS* 基因比 *CaDXS* 基因更适合作为辣椒沉默标记基因。
关键词: 病毒诱导的基因沉默; 八氢番茄红素脱氢酶; 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合酶; 辣椒; 标记基因; 烟草脆裂病毒
中图分类号: S641.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-390X (2024) 01-0125-07

Phenotypic Comparison of *CaDXS* and *CaPDS* Gene Silencing in *Capsicum annuum* L.

ZHANG Xin¹, GUI Min^{1,2}, LIU Di³, ZHANG Jinfeng⁴, LIU Yating³

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Horticultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;
3. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
4. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To silence the *CaDXS* and *CaPDS* gene of chili pepper, and to compare and analyse the differences of photobleaching phenotypes, finding new silent marker genes in capsicum. [Methods] The silencing vectors of *CaDXS* and *CaPDS* gene were constructed by double restriction endonuclease digestion. The chili pepper were infected by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and the silencing phenotypes of chili pepper were observed. The silence efficiency of *CaDXS* and *CaPDS* gene was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. [Results] At 21 days after infection of *A. tumefaciens*, the leaves of *CaDXS* gene silenced chili pepper turned chlorot-

收稿日期: 2023-04-12

修回日期: 2024-01-23

网络首发日期: 2024-03-21

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (32260681); 国家重点研发计划项目 (2021YFD1400200); 云南省重点项目 (2018FA019)。

作者简介: 张鑫 (1997—), 男, 四川内江人, 在读硕士研究生, 主要从事植物与病原物的互作研究。

E-mail: zhangxinyunkm@163.com

**通信作者 Corresponding author: 刘雅婷 (1971—), 女, 湖南祁东人, 博士, 教授, 主要从事植物病原微生物与寄主互作研究。E-mail: liuyating66@163.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240320.1748.001>



ic; the leaves of *CaPDS* gene silenced chili pepper began to appear photobleaching. About 30 days after infection of *A. tumefaciens*, the leaves of *CaDXS* gene silenced chili pepper showed obvious photobleaching; the photobleaching degree of *CaPDS* gene silenced chili pepper leaves intensified, and the new leaves were almost photobleaching. Compared with the *CaDXS* gene, the silencing of *CaPDS* gene resulted in a more obvious and efficient photobleaching phenotype in chili pepper. The expression levels of *CaDXS* and *CaPDS* gene in silenced chili pepper leaves were significantly decreased ($P < 0.05$), and the silence efficiency reached 86.80% and 93.08%, respectively, which further indicated that *CaDXS* and *CaPDS* gene in chili pepper were silenced successfully. [Conclusion] *CaDXS* gene can also be used as a visual marker gene in chili pepper, but *CaPDS* gene is a more suitable visual marker gene than *CaDXS* gene in chili pepper for the photobleaching phenotype appears earlier and more obviously.

Keywords: virus-induced gene silencing (VIGS); phytoene desaturase (PDS); 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS); *Capsicum annuum* L.; visual marker gene; *Tobacco rattle virus* (TRV)

病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是指携带目标基因 1 段 cDNA 的重组病毒载体侵染植物后, 可诱导植物发生基因沉默而出现表型突变, 通过植物表型或生理指标的变化, 进一步推测其基因功能的方法^[1-2]。辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 起源于中南美洲热带、亚热带地区, 大约在 16 世纪后期传入中国。截至 2019 年, 辣椒在中国的种植面积超过 $2.26 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 已是目前中国种植面积最广的蔬菜之一。近年来, 中国的辣椒总产量超过 $6.4 \times 10^7 \text{ t}$, 平均产量接近 $3 \times 10^4 \text{ kg/hm}^2$, 农业产值达 2500 亿元^[3], 在中国蔬菜作物中占有重要地位。利用 VIGS 技术挖掘辣椒在抗逆境 (病、虫、非生物胁迫等)、生长发育以及代谢调控中的相关基因, 对深入理解病原生物—辣椒相互作用、揭示辣椒品质性状形成机理、病虫害防控、辣椒品种改良等具有重要意义。在 VIGS 试验中, 往往需要沉默某基因使植株出现白化等明显表型, 以初步评估基因沉默效果, 这种基因即为沉默标记基因, 且以八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因最为常用。PDS 是类胡萝卜素合成途径中的关键酶, 催化无色的八氢番茄红素转变成有色的类胡萝卜素^[4]; 而类胡萝卜素在植物中具有光保护作用^[5], 其合成途径被阻断导致植物光保护功能丧失, 引起植株白化。在辣椒中, 除 PDS 基因外, 还有核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基基因 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small-subun-

it gene, *rbcS*), 沉默后叶片会出现变黄和褪绿^[6]; 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, *Chlorata42* 基因沉默 10~12 d 后叶片变黄^[7]; 在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中, 查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 基因沉默 1 个月后, 纯色牵牛花变为杂色花^[8]。寻找新的辣椒沉默标记基因, 对于辣椒 VIGS 技术的补充、完善以及辣椒基因功能的研究具有重要意义。

自 1995 年 KUMAGAI 等^[9]首次利用重组烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 在本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 中成功沉默 PDS 基因以来, 越来越多的病毒沉默载体被运用到 VIGS 技术中, 包括马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PV-X)^[10]、番茄金色花叶病毒 (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV)^[11]、烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV)^[12]、大麦条纹花叶病毒 (*Barley stripe mosaic virus*, BMSV)^[13] 等。RATCLIFF 等^[12]研究发现: 相较于 PVX 沉默载体, TRV 沉默载体引起的病毒侵染症状更轻, 能够在植物更多的组织中发挥沉默作用, 且持续时间更长, 沉默效率更高, 其原因可能是 TRV 沉默载体能够侵入植物的生长点。相较于其他病毒沉默载体, TRV 沉默载体寄主广泛^[14], 已被广泛运用于验证植物基因功能的科学研究中。

在高等植物中, 作为类胡萝卜素前体物质的异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 主要通过甲基赤藓糖醇 (methylerythritol phosph-

ate, MEP) 途径合成。在 MEP 途径中, 首先由 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 催化 3-磷酸甘油醛和丙酮酸缩合形成 1-脱氧木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP), 之后经过一系列的酶促反应最终生成 IPP^[15]。而 DXS 是 MEP 生物合成途径中的第 1 个关键酶^[16], 关键酶又被称为限速酶, 决定总反应的速度和方向, 沉默关键酶基因可能会对代谢过程产生更大的影响。

目前, TRV 介导的 VIGS 体系已经成功沉默 *CaPDS* 基因并使辣椒植株出现明显的白化^[6, 17]。如果沉默 *CaDXS* 基因, 阻断类胡萝卜素前体 IPP 的生成, 进而降低辣椒类胡萝卜素的含量, 辣椒同样可能产生白化表型。但利用 TRV 沉默体系沉默 *CaDXS* 基因, 辣椒能否出现白化以及与沉默 *CaPDS* 基因的辣椒表型有何区别还未见报道。本研究应用 TRV 诱导的基因沉默技术, 分别沉默辣椒的 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因, 比较分析沉默 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因的辣椒表型, 评估 *CaDXS* 基因作为辣椒沉默标记基因的潜力并验证 *CaDXS* 基因在辣椒类胡萝卜素合成过程中的功能, 为寻找新的辣椒沉默标记基因和 VIGS 技术的完善提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究供试辣椒品种为萧新 19 号, 购自安徽萧新种业有限公司, 其生长条件为 23 ℃ 光照 16 h, 21 ℃ 黑暗 8 h。

大肠杆菌感受态细胞 (*Trans1-T1 Phage Res-*

istant Chemically Competent Cell, 目录号: CD-501) 购自北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 股份有限公司; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 感受态细胞 (GV3101 Chemically Competent Cell, 目录号: AC1001) 购自上海唯地生物技术有限公司。病毒载体 pTRV1 和 pTRV2 均由云南农业大学植物保护学院陈小姣惠赠; pTRV2-*CaPDS* 由刘雅婷教授课题组构建。含有上述 3 种载体的根癌农杆菌 GV3101 菌株均保存于云南农业大学作物种质创新及可持续利用重点实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第 1 条链的合成

采用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取萧新 19 号辣椒的总 RNA; 提取完成后, 用无酶水溶解, -70 ℃ 冻存储备用。用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis 反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 将辣椒的总 RNA 反转录为 cDNA, 用无酶水溶解, -20 ℃ 冻存储备用。

1.2.2 辣椒 *DXS* 基因沉默片段的 PCR 扩增

根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 已公布的辣椒 *DXS* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_001398343.1), 利用 Solanaceae Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) 的 VIGS Tool (<https://vigs.solgenomics.net/>)^[18] 分析确定该基因的最佳沉默片段范围; 利用 NCBI 在线引物设计工具 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), 在最佳沉默片段的范围设计引物 (表 1) 并添加酶切位点和保护碱基。以辣

表 1 本研究使用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列 (5'→3') sequence	PCR产物长度/bp length of PCR products	目的 purpose
CaDXS-EcoRI-F	<u>GGAATTC</u> CTGTTGTACCGAGAAAGGCA	389	构建 <i>CaDXS</i> 基因的VIGS载体 constructing a VIGS vector for the <i>CaDXS</i> gene
CaDXS-KpnI-R	GGG <u>G</u> TACCCCTGGTCATAAGCCCTCTGC		
CaDXS-qF	ACACAGAGACCACCAACACC	170	检测 <i>CaDXS</i> 基因的相对表达量 detecting the relative expression level of the <i>CaDXS</i> gene
CaDXS-qR	AGCTCAACAACGCCAAGACT		
CaPDS-qF	CTGGAGGCAAGGGATGTTCT	198	检测 <i>CaPDS</i> 基因的相对表达量 detecting the relative expression level of the <i>CaPDS</i> gene
CaPDS-qR	TTCTCCTGGCTTGTGGCA		
UBI3-qF	TGTCCATCTGCTCTCTGTG	204	辣椒内参基因 as a reference gene for pepper
UBI3-qR	CACCCCAAGCACATAAGAC		

注: 划线部分为酶切位点, CaDXS-EcoRI-F 的酶切位点为 *EcoR* I, CaDXS-KpnI-R 的酶切位点为 *Kpn* I。

Note: The underlined parts are restriction sites, the restriction site of CaDXS-EcoRI-F is *EcoR* I, the restriction site of CaDXS-KpnI-R is *Kpn* I.

辣椒的 cDNA 为模板, 用高保真 PCR 酶 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 2×Phanta Flash Master Mix Dye Plus) 进行 PCR 反应扩增 *CaDXS* 基因沉默片段。PCR 反应程序为: 98 ℃ 预变性 30 s; 98 ℃ 变性 10 s, 59 ℃ 退火 5 s, 72 ℃ 延伸 2 s, 34 个循环; 72 ℃ 延伸 1 min。PCR 反应结束后, 产物于 -20 ℃ 保存。所有引物的合成和 DNA 序列的测定由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2.3 *CaDXS* 基因沉默载体的构建和转化

扩增 *CaDXS* 基因沉默片段的 PCR 产物经电泳检测后, 用 SteadyPure PCR 反应液纯化试剂盒 (艾科瑞生物工程有限公司) 对 *CaDXS* 基因的沉默片段进行纯化回收。采用 New England Biolabs 公司的限制性核酸内切酶 *EcoRI*-HF[®] 和 *KpnI*-HF[®] 双酶切 pTRV2 质粒载体和 *CaDXS* 基因沉默片段, 回收纯化酶切产物。采用 DNA 连接试剂盒 Ver.2.1 (宝日医生物技术有限公司) 连接双酶切的 pTRV2 质粒载体和 *CaDXS* 基因沉默片段, 并将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞^[19]。挑取阳性单克隆, 经菌落 PCR 检测后测序鉴定 PCR 产物, 测序验证正确的单克隆进行菌落液体振荡培养, -70 ℃ 保存备用并提取重组沉默载体 pTRV2-*CaDXS*; 沉默载体转化至根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中, -70 ℃ 保存备用^[20]。

1.2.4 农杆菌的准备和注射

将携带 pTRV1、pTRV2、pTRV2-*CaPDS* 和 pTRV2-*CaDXS* 载体的根癌农杆菌 GV3101 菌液在 YEB 液体培养基 (50 μg/mL 卡那霉素和 50 μg/mL 利福平) 中 28 ℃、180 r/min 振荡培养 12 h; 以转速 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入农杆菌浸润缓冲液^[21] (10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl₂ 和 200 μmol/L 乙酰丁香酮) 重新悬浮菌体, 调整菌液浓度至 OD₆₀₀ 值为 0.8。将携带 pTRV1 载体的农杆菌与携带 pTRV2、pTRV2-*CaPDS*、pTRV2-*CaDXS* 载体的农杆菌分别按体积比 1 : 1 混合, 置于 28 ℃ 恒温培养箱避光静置 3 h。用注射器针头轻划辣椒叶片背面, 去掉针头后将菌液注入辣椒第 1、2 片真叶, 并设置 3 个处理。① TRV: 注射 TRV1 和 TRV2 沉默空载的植株对照组; ② TRV-*CaDXS*: 注射 TRV1 和 TRV2-*CaDXS* 的植株处理组; ③ TRV-*CaPDS*: 注射 TRV1 和 TRV2-*CaPDS* 的植株处理组。注射

菌液后的辣椒植株置于 23 ℃ 避光处理 12 h, 再置于 23 ℃ 光照 16 h、21 ℃ 黑暗 8 h 的植物光照培养箱中培养。

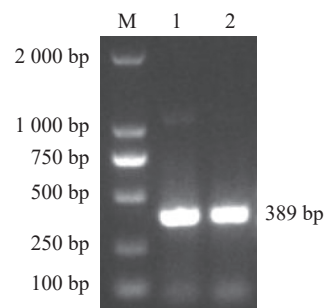
1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 *CaDXS* 基因和 *CaPDS* 基因的沉默效率

当 TRV-*CaDXS* 和 TRV-*CaPDS* 处理组的叶片出现白化后, 分别从处理组和注射沉默空载的对照组各取 3 株辣椒的第 5、6 片真叶, 提取 RNA 作为 3 个生物学重复, 反转录为 cDNA。荧光定量 PCR 的每个生物学重复针对内参基因、*CaDXS* 基因和 *CaPDS* 基因进行 4 个技术重复。反转录 (HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR) 和 qPCR 试剂 (*Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。以辣椒泛素结合蛋白 (ubiquitin-conjugating protein, UBI-3) 基因作为内参基因^[22], 所用引物序列见表 1, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 反应。采用 2^{-ΔΔCt} 法^[23] 计算 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的相对表达量, 并用 GraphPad Prism 8 作图。

2 结果与分析

2.1 *CaDXS* 基因沉默片段的扩增

辣椒 *DXS* 基因沉默片段的 PCR 扩增获得单一清晰的目的条带, 片段为 389 bp, 与预期大小一致 (图 1)。



注: M. DL2000 DNA Marker; 1. 退火温度 57 ℃ 下的 PCR 扩增产物; 2. 退火温度 59 ℃ 下的 PCR 扩增产物。

Note: 1. PCR amplification product at the annealing temperature of 57 ℃; 2. PCR amplification product at the annealing temperature of 59 ℃.

图 1 *CaDXS* 基因沉默片段的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification product of silencing fragment of *CaDXS* gene

2.2 沉默 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因的辣椒叶片表型

农杆菌注射到辣椒叶片 10 d 后, 注射叶叶柄断裂。注射 21 d 后, TRV 处理的辣椒植株叶片

未白化; 沉默 *CaPDS* 基因的辣椒第 5、6 片真叶靠近叶柄处的局部开始出现白化现象; 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒第 5、6 片真叶开始出现褪绿现象。注射约 30 d, 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒叶片也逐渐出现明显的白化 (图 2a); 沉默 *CaPDS* 基因的辣椒叶片, 其白化面积从靠近叶柄处逐渐蔓延扩大 (图 2b)。注射 33 d, 沉默 *CaPDS* 基因的辣椒新生叶几乎白化, 第 5、6 片真叶大部分白

化, 局部有绿色; 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒第 5、6 片真叶出现明显且均匀的白化 (图 2c)。沉默 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因的辣椒均有 4 株白化; 相较于沉默 *CaPDS* 基因, 沉默 *CaDXS* 基因的辣椒约晚 9 d 出现白化, 白化程度不够彻底; TRV 处理的辣椒植株叶片则始终未出现白化, 且沉默 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因的辣椒植株相较于 TRV 处理的辣椒植株偏小 (图 2c)。



注: a) 和 b) 分别为被携带 *CaDXS* 序列和 *CaPDS* 序列的 TRV 重组载体侵染 30 d 后的辣椒叶片表型; c) 被 TRV-*CaDXS*、TRV 和 TRV-*CaPDS* 侵染 33 d 的辣椒叶片表型。

Note: a) and b) phenotype of pepper leaves at 30 days after infection of recombinant TRV carrying the *CaDXS* sequence and *CaPDS* sequence, respectively; c) comparison of the phenotypes of pepper leaves infected with TRV-*CaDXS*, TRV and TRV-*CaPDS* for 33 days.

图 2 沉默 *CaPDS* 和 *CaDXS* 基因的辣椒叶片表型

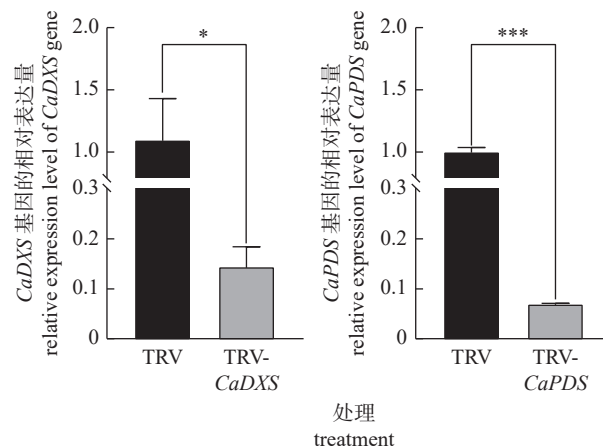
Fig. 2 Phenotypes of the leaves of chili pepper plants by *CaPDS* and *CaDXS* gene silenced

2.3 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的沉默效率

CaDXS 基因在沉默辣椒中的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 沉默效率为 86.80%; *CaPDS* 基因在沉默辣椒中的表达量极显著低于对照组 ($P < 0.001$), 沉默效率为 93.08% (图 3)。

3 讨论

辣椒表型观察和实时荧光定量 PCR 结果表明: *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因均被成功沉默。李杰等^[24]使用 TRV 沉默载体分别沉默辣椒番茄红素 β -环化酶 (lycopene β -cyclase, *Lcyb*) 基因、芸薹素唑耐受因子 1 (brassinazole-resistant 1, *BZR1*) 基因和 *CaPDS* 基因, 结果表明: *CaPDS*、*CaLcyb* 和 *CaBZR1* 基因表达量均显著降低, 且沉默组辣椒叶片的类胡萝卜素含量显著低于正常对照植株; 在沉默组中, 类胡萝卜素含量从低到高依次为沉默 *CaPDS*、*CaLcyb*、*CaBZR1* 基因的辣椒; 观察沉默 21 d 后的表型, 沉默 *CaPDS* 基因的叶片出现白化, 沉默 *CaLcyb* 基因的叶片颜色变浅, 沉默 *CaBZR1* 基因的植株生长受到抑制, 表明类胡萝卜素含量越低, 叶片颜色变化越明显。已报道的沉默标记基因通过阻断类胡萝卜素或叶绿素



注: “*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “***”表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

Note: “*” indicates significant differences ($P < 0.05$), “***” indicates extremely significant differences ($P < 0.001$).

图 3 处理组和对照组 *CaDXS* 和 *CaPDS* 基因的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression levels of *CaDXS* and *CaPDS* gene in treated group and control group

的合成影响叶色, 通过阻断与花色形成密切相关的类黄酮等物质合成影响花色。

本研究沉默的 2 个基因和沉默拟南芥 *Chlorata42* 基因的共同点是改变叶色, 但不同点在于本研究的 2 个沉默标记基因处于类胡萝卜素合

成途径,拟南芥 *Chlorata42* 基因处于叶绿素合成途径。沉默 *Chlorata42* 基因的拟南芥叶片出现黄化,其原因可能是沉默基因阻碍镁螯合酶复合物的形成,进而减弱叶绿素的合成^[25-26]。TURNAGE 等^[25]和 BURCH-SMITH 等^[7]先后利用甘蓝曲叶病毒 (*Cabbage leaf curl virus*, CbLCV) 沉默载体和 TRV 沉默载体沉默拟南芥 *Chlorata42* 基因, CbLCV 沉默载体诱导的拟南芥新叶在沉默 21~28 d 后黄化,而 TRV 沉默载体诱导的新叶在沉默 10~12 d 后黄化。

与改变叶色的沉默标记基因不同,沉默 *CHS* 基因改变的是花色。沉默 *CHS* 基因的植株呈现花色变白的现象,可能是阻碍了对花色形成起主要作用的类黄酮物质(如花青素)的生物合成^[27-29]。TRV 沉默载体沉默毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha*) 红色花瓣中的 *AeCHS* 基因,约 20 d 出现花瓣漂白现象,花青素含量显著降低^[30]。利用改良的中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV) 卫星 DNA 沉默载体沉默矮牵牛 *PbCHS* 基因,1 个月后纯色牵牛花变为杂色花^[8]。因此,利用 VIGS 技术研究基因功能时,应考虑基因表达的组织特异性。

沉默 *rbcS* 基因的植株出现变黄和褪绿可能是由于沉默该基因导致核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 全酶成分的缺乏。*rbcS* 基因编码稳定 Rubisco 全酶结构所必需的小亚基^[31],而 Rubisco 是植物光合作用反应固定 CO₂ 的关键酶并参与光呼吸途径^[32]。研究表明:烟草 *rbcS* 反义突变体 AL5 中的 Rubisco 含量仅为正常烟草的 20%,总叶绿素和类胡萝卜素的含量也仅为正常烟草的 50%^[33];也有研究表明:TRV 载体沉默本氏烟的 *rbcS* 基因后, Rubisco 大、小亚基含量均显著降低,总叶绿素和类胡萝卜素含量也显著降低,叶片变黄^[34]。以上研究表明:*rbcS* 含量的降低导致 Rubisco 含量降低,但 Rubisco 含量降低的植株中总叶绿素和类胡萝卜素含量也降低的机制尚不清楚。

本研究表明:沉默 *CaDXS* 基因的辣椒出现明显白化的时间晚于沉默 *CaPDS* 基因的辣椒。分析其原因可能是沉默 *CaDXS* 基因导致 DXP 减少,该物质减少造成的影响在生物合成途径中逐级传递至类胡萝卜素。*CaDXS* 处于类胡萝卜素生物合

成途径的上游, *CaPDS* 基因处于下游,沉默 *CaDXS* 基因后,需要更长的时间才能将 DXP 减少的影响传递至类胡萝卜素,故沉默 *CaDXS* 基因的辣椒出现明显白化的时间较晚。相较于沉默 *CaPDS* 基因的辣椒,沉默 *CaDXS* 基因的辣椒白化不够彻底可能与生物合成途径中的代谢调节有关。沉默较上游的 *CaDXS* 基因可能导致更多种类胡萝卜素前体减少,但辣椒细胞可能通过调整更多的代谢途径增加对类胡萝卜素各种前体的合成,以减缓类胡萝卜素生物合成的受影响程度。

4 结论

本研究成功构建了 TRV 介导的 *CaDXS* 基因沉默载体。*CaDXS* 基因沉默后出现白化现象,说明该基因可作为辣椒基因沉默试验候选的标记基因,扩大了辣椒沉默标记基因的范围,为丰富辣椒沉默标记基因提供了参考。相较于沉默 *CaDXS* 基因的辣椒,沉默 *CaPDS* 基因的辣椒植株白化表型出现得更早且明显,因此 *CaPDS* 基因比 *CaDXS* 基因更合适作为辣椒沉默的标记基因。

[参考文献]

- [1] 陶小荣,周雪平,崔晓峰,等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(9): 777. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3282.2004.09.003.
- [2] BURCH-SMITH T M, ANDERSON J C, MARTIN G B, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. The Plant Journal, 2004, 39(5): 734. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.20-04.02158.x.
- [3] 邹学校,马艳青,戴雄泽,等. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1722. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0103.
- [4] 李春季,李炳学,韩晓日. 八氢番茄红素脱氢酶的研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1680. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20160089.
- [5] 赵文恩,韩雅珊,戴蕴青. 类胡萝卜素的生物学性质[J]. 生物学杂志, 1998, 15(3): 1.
- [6] CHUNG E, SEONG E, KIM Y C, et al. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang)[J]. Molecules and Cells, 2004, 17(2): 377. DOI: 10.1016/S1016-8478(23)13054-8.
- [7] BURCH-SMITH T M, SCHIFF M, LIU Y, et al. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2006, 142(1): 23. DOI: 10.1104/pp.106.084624.
- [8] 陶小荣,钱亚娟,周雪平. 卫星DNA沉默载体的改良及其改变矮牵牛叶色和花色的研究[J]. 科学通报, 2006, 51

- (17): 2043. DOI: [10.3321/j.issn:0023-074X.2006.17.012](https://doi.org/10.3321/j.issn:0023-074X.2006.17.012).
- [9] KUMAGAI M H, DONSON J, DELLA-CIOPPA G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(5): 1681. DOI: [10.1073/pnas.92.5.1679](https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679).
- [10] RUIZ M T, VOINNET O, BAULCOMBE D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing[J]. Plant Cell, 1998, 10(6): 938. DOI: [10.1105/tpc.10.6.937](https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937).
- [11] KJEMTRUP S, SAMPSON K S, PEELE C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus[J]. The Plant Journal, 1998, 14(1): 94. DOI: [10.1046/j.1365-313X.1998.00101.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00101.x).
- [12] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. The Plant Journal, 2001, 25(2): 240. DOI: [10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x](https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x).
- [13] HOLZBERG S, BROSIO P, GROSS C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant[J]. The Plant Journal, 2002, 30(3): 319. DOI: [10.1046/j.1365-313X.2002.01291.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01291.x).
- [14] 黄昌军, 钱亚娟, 李正和, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组研究中的应用[J]. 中国科学(生命科学), 2012, 42(1): 4.
- [15] 张建成, 刘和. 植物类胡萝卜素生物合成及其调控与遗传操作[J]. 中国农学通报, 2007, 23(11): 213. DOI: [10.3969/j.issn.1000-6850.2007.11.047](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-6850.2007.11.047).
- [16] 马转转, 庞满卿, 湛容, 等. 萜类化合物生物合成途径中关键酶的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2015, 14(6): 611. DOI: [10.3969/j.issn.1674-232X.2015.06.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-232X.2015.06.010).
- [17] 张庆琛, 魏理, 丁锦平, 等. 辣椒病毒诱导基因沉默体系的构建[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 135. DOI: [10.16366/j.cnki.1000-2367.2012.05.020](https://doi.org/10.16366/j.cnki.1000-2367.2012.05.020).
- [18] FERNANDEZ-POZON, ROSLI HERNAN G, MARTIN GREGORY B, et al. The SGN VIGS tool: user-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) constructs for functional genomics[J]. Molecular Plant, 2015, 8(3): 486. DOI: [10.1016/j.molp.2014.11.024](https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.024).
- [19] 张爱联. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009.
- [20] 潘雷雷, 纪红昌, 黄建斌, 等. 花粉管通道和农杆菌介导的花生 *AhFatB* 基因编辑[J]. 华北农学报, 2020, 35(4): 66. DOI: [10.7668/hbnxb.20190658](https://doi.org/10.7668/hbnxb.20190658).
- [21] 李慧芳, 桂敏, 张萍萍, 等. 辣椒上TRV介导的番茄斑萎病毒N基因沉默体系构建及鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(3): 411. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202005019](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202005019).
- [22] WAN H J, YUAN W, RUAN M Y, et al. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 416(1/2): 24. DOI: [10.1016/j.bbrc.2011.10.105](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.105).
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402. DOI: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
- [24] 李杰, 罗江宏, 杨萍. 沉默辣椒 *Lcyb* 和 *BZRI* 基因对其叶片类胡萝卜素积累的影响[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(1): 47. DOI: [10.3969/j.issn.1674-7968.2021.01.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7968.2021.01.005).
- [25] TURNAGE M A, MUANGSAN N, PEELE C G, et al. Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2002, 30(1): 107. DOI: [10.1046/j.1365-313X.2002.01261.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01261.x).
- [26] 刘子琦, 汪佳. 镁螯合酶的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(1): 18. DOI: [10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.01.03](https://doi.org/10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.01.03).
- [27] 张党权, 谭晓风, 王晓红. 查尔酮合酶与查尔酮异构酶基因特征及转基因应用[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(2): 91. DOI: [10.3969/j.issn.1673-923X.2007.02.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-923X.2007.02.016).
- [28] 郭凤丹, 王效忠, 刘学英, 等. 植物花青素生物代谢调控[J]. 生命科学, 2011, 23(10): 938. DOI: [10.13376/j.cbbs/2011.10.011](https://doi.org/10.13376/j.cbbs/2011.10.011).
- [29] TANAKA Y, BRUGLIERA F, KALC G, et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(9): 1760. DOI: [10.1271/bbb.100358](https://doi.org/10.1271/bbb.100358).
- [30] LI Y K, CUI W, QI X J, et al. Chalcone synthase-encoding *AeCHS* is involved in normal petal coloration in *Actinidia eriantha*[J]. Genes, 2019, 10(12): 949. DOI: [10.3390/genes10120949](https://doi.org/10.3390/genes10120949).
- [31] 周昱婕, 李霞, 陈根云, 等. 植物RuBisCO研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2023, 53(9): 1215. DOI: [10.1360/SSV-2022-0275](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0275).
- [32] 何亚飞, 李霞, 谢寅峰. Rubisco与Rubisco活化酶的分子机理研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3295. DOI: [10.13271/j.mpb.015.003295](https://doi.org/10.13271/j.mpb.015.003295).
- [33] SCHOEFS B, DARKO E, RODEMEL S. Photosynthetic pigments, photosynthesis and plastid ultrastructure in RbcS antisense DNA mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2001, 56(11/12): 1071. DOI: [10.1515/znc-2001-11-1225](https://doi.org/10.1515/znc-2001-11-1225).
- [34] 周晓馥. 病毒载体诱导转录后基因沉默系统的建立及烟草(*Nicotiana benthamiana*) *rbcS* 基因功能的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2003.

责任编辑: 何承刚