

• 药材与资源 •

烟草脆裂病毒介导的人参基因沉默体系的构建

李冉琪¹, 李雅淑¹, 汤淼淼¹, 曲正义¹, 郑培和^{2*}, 侯 微^{1*}

1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132109

摘要:目的 人参 *Panax ginseng* 中构建烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 介导的基因沉默体系, 为人参中基因功能的验证提供新方法。方法 通过序列比对得到人参中八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因的完整序列, 利用保守结构域预测工具得到核心片段, 将其整合进 pTRV2 载体内。重组载体转化农杆菌后侵染人参叶片, 观察表型并利用 qPCR 检测沉默效率。结果 通过序列比对得到了 2 条 PDS 基因。PgPDS1 基因 cDNA 序列全长 1 746 bp, 编码 581 个氨基酸; PgPDS2 基因 cDNA 序列全长 1 299 bp, 编码 432 个氨基酸。2 个 PgPDS 蛋白均具有典型的 PDS 结构域。将重组载体通过农杆菌转化人参叶片, 接种 3 周后叶片表型无变化, 5 周后叶片尖端以及边缘出现枯萎现象。经 qPCR 检测, 接种后 3 周和 5 周人参内源 PgPDS 基因表达量分别下降至接种前的 70.37% 和 37.35%, 表明体系构建成功。结论 人参中成功构建了 TRV 介导的基因沉默体系。

关键词: 病毒诱导的基因沉默; 人参; 八氢番茄红素脱氢酶; 烟草脆裂病毒; 农杆菌

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0232-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.023

Construction of TRV-mediated gene silencing system in *Panax ginseng*LI Ranqi¹, LI Yashu¹, TANG Miaomiao¹, QU Zhengyi¹, ZHENG Peihe², HOU Wei¹

1 Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

2 Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132109, China

Abstract: Objective Constructing the tobacco rattle virus (TRV)-mediated gene silencing system in *Panax ginseng* provides a new method for the verification of gene function in ginseng. **Methods** The complete sequence of *phytoene desaturase* (PDS) gene was obtained by sequence alignment. Using the conserved domain prediction tool to obtain the core fragment of PDS gene, which was integrated into the pTRV2 vector. The recombinant vector transformed *Agrobacterium* to infect ginseng leaves, observing the phenotype after a period of time, and detecting the silencing efficiency by qPCR. **Results** A total of two PDS genes were obtained by sequence alignment. The cDNA sequence of PgPDS1 gene is 1 746bp in length, encoding 581 amino acids; the cDNA sequence of PgPDS2 gene is 1 299 bp in length, encoding 432 amino acids. Both of them have typical PDS conserved domains. The recombinant vector was transformed into ginseng leaf by *Agrobacterium*, the phenotype of leaves didn't change after 3 weeks, but the tips and edges of the leaves were wilted after 5 weeks. The results of qPCR showed that the expression of PgPDS gene decreased to 70.37% (3 weeks later) and 37.35% (5 weeks later), respectively, indicating that the system was successfully constructed. **Conclusion** TRV-mediated gene silencing system was successfully constructed in *P. ginseng*.

Key words: Virus-induced gene silencing; *Panax ginseng* C. A. Meyer; phytoene desaturase; tobacco rattle virus; *Agrobacterium*

基因沉默现象是一种由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 引起的基因表达受到抑制的现象, 是一种基于序列同源性的过程^[1]。

在真核生物中, 基因沉默又称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。这一现象首次发现于 1990 年, Carolyn Napoli 等将花椰菜花叶病毒的 35S 启动子

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1600900); 吉林省科技发展规划项目 (20170309007YY); 吉林省自然科学基金项目 (20170101011JC)

作者简介: 李冉琪 (1999—), 男, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源评价研究。

*通信作者: 郑培和 (1973—), 男, 吉林抚松人, 博士, 教授, 主要从事人参等中药资源评价与利用研究工作。E-mail: china_ginseng@126.com
侯 微 (1981—), 女, 吉林省吉林市人, 博士, 副研究员, 主要从事药用植物活性成分评价研究。E-mail: jilinhouwei@163.com

与查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)基因的编码序列融合,将重组的CHS基因通过农杆菌导入矮牵牛中,期望加深矮牵牛花的紫色,但结果却与预期完全相反:转入的基因未表达,且内源CHS的表达水平也发生了下降,笔者将这种现象称为“可逆共抑制”(reversible co-suppression)^[2]。对基因沉默现象机制的认识来源于1998年Fire等^[3]的线虫实验,实验结果表明外源双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)是基因沉默现象的高效诱发因子。Mansoor等^[4]总结了植物体内3种不同的RNAi机制:(1)转录后水平基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS),指dsRNA在细胞质中引起mRNA的切割降解;(2)microRNAs(MiRNAs)与特定mRNAs的碱基配对负调控基因的表达,导致内源mRNA降解或蛋白质翻译停止;(3)转录水平基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS),是由于DNA的序列特异性甲基化导致的基因沉默。基因沉默的过程通常分为3个步骤:(1)小RNA(small RNA, sRNA)的形成。sRNA由RNase III家族的Dicer酶通过切割dsRNA形成,长度一般为19~25个核苷酸,序列与目标mRNA互补^[5],包括小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)和Piwi相互作用RNA(Piwi-interacting RNA, piRNA)^[6]。(2)sRNA与RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,RISC获得剪切活性。部分sRNA还可以在RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的作用下继续合成dsRNA以放大沉默效果^[7]。(3)具有活性的RISC与目标mRNA结合,降解目标RNA或抑制其翻译。RISC不仅可以介导PTGS,还可以介导TGS^[8]。利用这一原理,近年来,病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术在研究植物功能基因方面得到了越来越广泛的应用。VIGS技术是一种功能基因组学工具,将目的基因的cDNA片段通过病毒载体导入植株,引起同源基因mRNA的降解或基因本身的甲基化修饰,目的基因被沉默进而造成植株产生表型变化,从而达到验证基因功能的目的^[9]。八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素合成途径中的关键酶,该基因被沉默后叶片因失去类胡萝卜素的光保护作用而通常表现出光漂白现象,表型明显,易于观察。因此在多种植物基因沉默体系的构

建中,PDS基因常作为沉默靶基因被选用,如拟南芥^[10]、小麦^[11]、辣椒^[12]、高粱^[13]等。在病毒载体的选择上,烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)应用最为广泛,相对于其他病毒载体,其具有沉默效果持续时间长、效率高、症状轻等优点。通常使用农杆菌侵染法将病毒载体导入植物体内。

人参*Panax ginseng* C. A. Meyer是五加科人参属多年生草本植物,是一种名贵中药。作为一种根类药用植物,人们对其的关注点大多在人参中的活性成分人参皂苷上,因而通过基因沉默手段研究的多是人参皂苷合成途径中的基因,如达玛烷合成酶(dammarenydiol synthase, DDS)基因^[14]、角鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SQE)基因^[15-16]、 β -香树脂醇合酶(β -amyrin synthase, β -AS)基因^[17-18]等,实验对象也均为发根农杆菌产生的毛状根。同时,发根农杆菌介导的遗传转化体系也为工业生产人参皂苷提供了新途径^[19-21]。但由于目前基于组织培养的人参再生体系尚不成熟^[22],在毛状根中建立的基因沉默体系并不能满足对所有基因功能的研究。因此本实验旨在尝试构建人参植株中的基因沉默体系,利用根癌农杆菌转化沉默载体实现侵染,为今后人参中基因功能的验证提供新的方法。

1 材料

1.1 植物材料、菌株与质粒

实验使用4年生人参种植于中国农业科学院特产研究所温室,大肠杆菌DH5 α 购于北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司,农杆菌LBA4404购于北京华越洋生物科技有限公司,病毒侵染载体pTRV1和pTRV2购于武汉淼灵生物科技有限公司。

1.2 试剂

EcoRI限制性内切酶(上海碧云天生物技术有限公司),BamHI限制性内切酶(上海碧云天生物技术有限公司),TransZol Up Plus RNA Kit(北京全式金生物技术有限公司),pEASY[®]-T1 Simple Cloning Kit(北京全式金生物技术有限公司),TIANprep Mini Plasmid Kit(北京天根生化科技有限公司),TIANGel Midi Purification Kit(北京天根生化科技有限公司),PerfectStart[®] Uni RT&qPCR Kit(北京全式金生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 人参PDS基因核心片段的克隆

根据课题组前期转录组数据结果,使用拟南芥

AtPDS3 基因的 cDNA 序列作为参考进行序列对比, 选择相似度高的序列作为候选基因。对基因序列进行分析, 使用 NCBI 的 Batch CD-search 工具预测保守结构域, 作为核心片段的选取依据。使用 Oligo 7 Primer Analysis Software 设计引物用

于克隆 *PgPDS* 核心片段, 引物位于人参 PDS 家族基因的共有保守序列部分。上、下游引物分别添加 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切接头序列(表 1)。以人参 cDNA 为模板进行扩增, 切胶回收后进行测序, 确认为目的基因片段。

表 1 所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')	用途
PgPDS-F	GAATTCTGGATGAGAAAGCAAGGTAT	<i>PgPDS</i> 核心片段克隆 (添加 <i>EcoRI</i> 接头序列)
PgPDS-R	GGATCCCTTCAGGTAAAAGGAGCTTC	<i>PgPDS</i> 核心片段克隆 (添加 <i>BamHI</i> 接头序列)
pTRV1-F	GAGCAGCAACCGACGACTTGATC	用于 pTRV1 质粒转化鉴定
pTRV1-R	TTTGAATGTCTCTCCTTGCGACT	
pTRV2-F	TTACTCAAGGAAGCACGATG	用于 pTRV2 质粒转化鉴定
pTRV2-R	CACGGATCTACTTAAAGAAC	
qPDS-F	CAGCCACCTTTCCACCAAGA	<i>PgPDS</i> 基因定量
qPDS-R	TCATCCTTTCGTACTGCTCC	
PgGAPDH-F	CACGGTCCCTGGAAGCA	人参定量内参基因
PgGAPDH-R	CATTGACACCCACAACAAACAT	

2.2 pTRV2-pgPDS 侵染载体的构建

使用测序正确的回收片段进行 TA 克隆, 将 TA 克隆质粒、pTRV2 空载质粒使用 *EcoRI* 与 *BamHI* 分别进行双酶切, 切胶回收 *PgPDS* 核心片段与线性化的 pTRV2 载体, 使用 T4 DNA 连接酶进行连接; 产物测序显示连接正确, 热激法转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有 50 mg/L 卡那霉素的平板上涂板筛选, 挑取菌落扩大培养。使用质粒小提试剂盒提取重组质粒 pTRV2-*PgPDS*, 根据说明书, 将 pTRV1、pTRV2 以及重组质粒 pTRV2-*PgPDS* 分别转化农杆菌 LBA4404, 在含有 50 mg/L 卡那霉素 (Kan) 和 20 mg/L 的利福平 (Rif) 的平板上筛选阳性菌落, 挑取阳性菌落于含有 50 mg/L Kan 和 20 mg/L Rif 的 LB 液体培养基中, 活化培养一段时间后使用对应引物(表 1)进行菌液 PCR 鉴定。

2.3 沉默体系的建立

分别取 1 mL 转化成功的农杆菌菌液加到 15 mL 的 LB 液体培养基 (同样含 50 mg/L Kan 与 20 mg/L Rif) 中扩大培养, 摇床设置 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件。待农杆菌摇菌至 $A_{600}=0.6$ 左右时, 5 000 r/min 离心收集菌体, 使用等体积侵染液 (含 10 mmol/L MgCl_2 、10 mmol/L MES 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮) 轻轻重悬菌体, 使菌液 A_{600} 仍为 0.6 左右, 暗处培养 4~6 h。后将等体积的 pTRV1 农杆菌重悬液与 pTRV2 农杆菌重悬液混合作为阴性对照, 等体积的 pTRV1 农杆菌重悬液与 pTRV2-*PgPDS* 农杆菌重悬液混合作为实验组, 另设空白对照不做处理。采用

菌液注射法, 在叶片背面使用无菌注射器针头制造伤口, 但不刺透叶片, 之后取下针头, 用注射器吸取 1 mL 重悬菌液, 压紧伤口将菌液注射进叶片直至伤口周围区域呈现水渍状, 每组设 3 个重复, 感染后的植株置于黑暗中 24 h, 之后于 22 $^{\circ}\text{C}$ 、光周期为光照/黑暗 12 h : 12 h 的温室培养。

2.4 qPCR 计算人参 PgPDS 相对表达量

每株于处理前、处理后第 3 周以及处理后第 5 周采集叶片, 提取总 RNA, 以反转录后的 cDNA 为模板, 使用引物 qPDS-F 和 qPDS-R (表 1), 通过 qPCR 检测内源 PDS 基因的表达量, 选择 *PgGAPDH* 作为内参基因^[23], 每个样品进行 3 个技术重复。为避免个体差异带来的影响, 本实验中未采用其他物种研究中以空白组为基准计算阴性组与实验组相对表达量的方法, 而是将单株接种前后的表达量进行对比。具体操作如下: 选取人参掌状复叶上处于对称位置的 2 片大叶片 (图 1), 接种

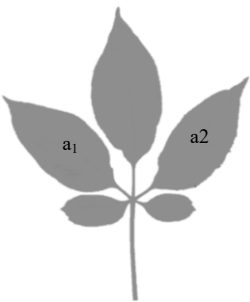


图 1 人参掌状复叶

Fig. 1 Palmate compound leaf of *Panax ginseng*

前采集 a_1 ，后注射接种 a_2 ，一段时间后采集 a_2 ，计算表达量时以 a_1 为参比计算 a_2 的相对表达量。按照上述流程在每株上选取 2 个掌状复叶进行操作，分别用于第 3 周和第 5 周的样品采集以及表达量的计算。使用 DPS 数据处理系统对结果进行处理，采用完全随机设计单因素方差分析中的 Duncan 新复极差法进行差异显著性分析，使用 Microsoft Excel 2019 进行图表绘制。

3 结果与分析

3.1 PgPDS 基因核心片段的克隆

根据序列比对，筛选出 2 条符合要求的序列，分别命名为 *PgPDS1* 与 *PgPDS2*。*PgPDS1* 基因 cDNA

序列全长 1 746 bp，编码 581 个氨基酸（图 2-A）；*PgPDS2* 基因 cDNA 序列全长 1 299 bp，编码 432 个氨基酸（图 2-B）。使用 NCBI 中的 Batch CD-search 工具对 2 条序列进行保守结构域预测（图 3），结果显示 *PgPDS1* 与 *PgPDS2* 蛋白均具有典型的 PDS 蛋白结构域，表示二者都属于 PDS 超基因家族。使用植物总 RNA 提取试剂盒提取人参叶片 RNA，使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。使用反转录试剂盒合成 cDNA，以其为模板，使用引物 *PgPDS-F* 与 *PgPDS-R*（表 1）扩增 *PgPDS* 家族基因共有核心片段，克隆出的核心片段理论长度为 391 bp（图 4），片段大小符合预期。使用胶回收试剂盒回收目的基

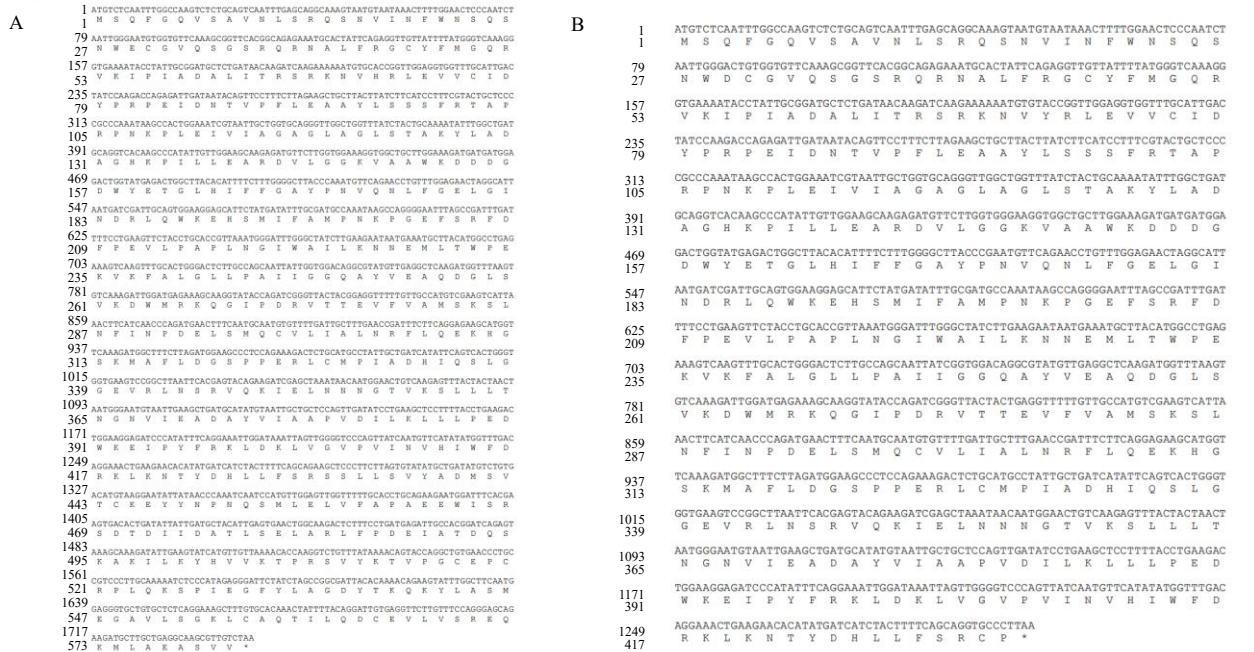


图 2 *PgPDS1* (A) 与 *PgPDS2* (B) 蛋白序列

Fig. 2 *PgPDS1* (A) and *PgPDS2* (B) protein sequences

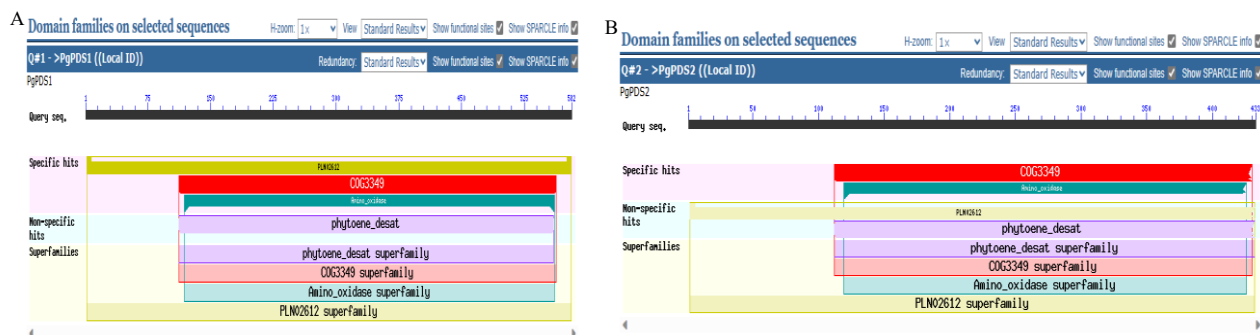
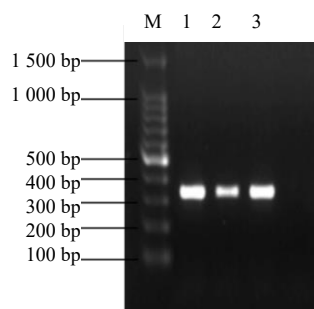


图 3 *PgPDS1* (A) 与 *PgPDS2* (B) 的蛋白保守结构域

Fig. 3 Protein conserved domains of *PgPDS1* (A) and *PgPDS2* (B)



M-Marker, 1~3-扩增产物。

M-Marker, 1~3-amplification products.

图 4 *PgPDS* 基因核心片段扩增Fig. 4 Amplification of the *PgPDS* gene core fragment

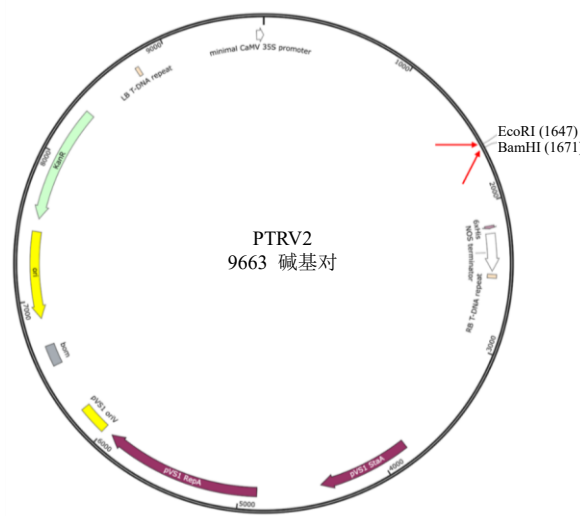
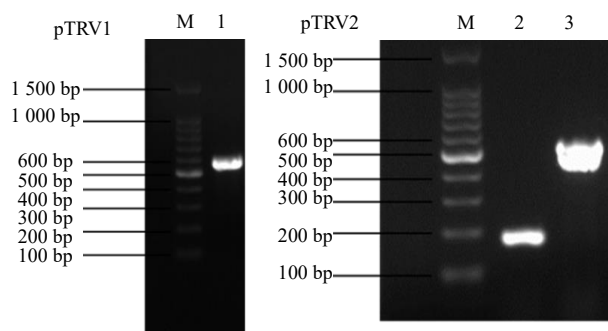
因片段用于后续载体构建。

3.2 pTRV2-PgPDS 侵染载体的构建

使用双酶切法将 *PgPDS* 基因片段整合至 pTRV2 载体中 (图 5), 将重组质粒转入 DH5 α , 扩大培养后提取质粒, 将 3 种质粒分别转化农杆菌, 使用对应引物 (表 1) 进行菌液 PCR, 3 种菌液 (转 pTRV1、pTRV2 和 pTRV2-*PgPDS*) 扩增出的 PCR 产物理论长度分别为 572、176、537 bp (图 6), 说明转化成功。

3.3 pTRV2-PgPDS 侵染人参叶片的表型观察与表达量分析

选择完全展开的人参叶片, 使用含有 pTRV2

图 5 pTRV2 质粒图谱及 *PgPDS* 片段插入位置Fig. 5 pTRV2 plasmid map and insertion location of *PgPDS* fragment

M-Marker 1-pTRV1 2-pTRV2 3-pTRV2-PgPDS

图 6 转 3 种质粒的菌液阳性克隆检测

Fig. 6 Positive clone detection of bacteria liquid with 3 kinds of plasmids

空载与 pTRV2-*PgPDS* 重组载体的农杆菌侵染液注射侵染。在接种后 3 周观察表型, 3 组均未出现叶片白化现象 (图 7); 继续观察至第 5 周时, 空白对照组与阴性对照组叶片无变化, 实验组人参植株部



图 7 第 3 周叶片表型

Fig. 7 Leaf phenotype at week 3

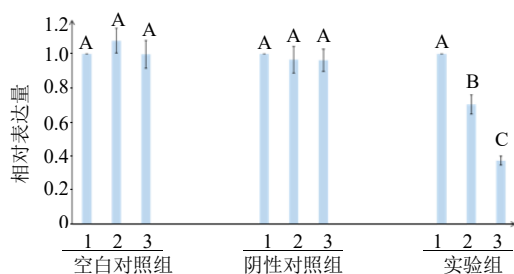
分叶片中间出现褪绿斑点, 叶尖、叶缘出现黄化、枯萎等现象 (图 8)。

采集接种前、接种后 3 周、接种后 5 周的叶片, 提取 RNA, 通过 qPCR 方法计算内源 *PgPDS* 基因表达水平。从结果 (图 9) 可以看出, 空白对照组与阴性对照组 3 个时期 *PgPDS* 基因表达量变化不大, 而实验组则呈明显下降趋势, 3 周时 *PgPDS* 的基因的表达量是接种前的 70.37%, 5 周时则降至



图 8 第 5 周叶片表型

Fig. 8 Leaf phenotype at week 5



1-初始, 2-第 3 周, 3-第 5 周; 不同大写字母表示处理间存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

1-initial, 2-week 3, 3-week 5; Different uppercase letters in the bar chart indicate significant differences between treatments ($P < 0.01$).

图 9 不同组 *PgPDS* 基因的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of *PgPDS* in different groups

37.35%, 说明在人参植株内成功实现了侵染, 且基因沉默载体成功发挥作用。表明了人参中农杆菌介导的基因沉默体系构建成功。

4 讨论

本研究通过序列对比的方式得到了 2 条人参 *PgPDS* 基因, 克隆家族核心保守片段后构建病毒侵染载体, 注射转化人参叶片, 抑制了人参内源 *PgPDS* 基因的表达, 表明体系构建成功。在病毒侵染后植株表型变化方面, 多数物种会表现出白化现象, 且需要的时间与白化程度各不相同: 如高粱叶片出现白化需要 28 d^[13]; 拟南芥经历 21 d, 发生白化现象的部位有叶片、茎、花蕾^[24]; 本氏烟 *Nicotiana benthamiana* 与柑橘属 *Citrus* L. 作物在接种后也均会发生不同程度的白化现象^[25]。而有些植物在 *PDS* 基因被沉默后叶片并无表型变化, 如茶花 *Camellia* sp. 在接种后 4 周叶片未表现出白化表型, 但 qPCR 结果显示内源 *CjPDS* 基因得到了有效沉默^[26]。在本实验中, 实验组叶片在接种后 5 周叶片上出现褪绿斑点, 叶尖、叶缘出现了黄化与枯萎现象, 而空白对照组与阴性对照组均未出现。查阅资料发现在其余物种中没有枯萎现象出现, 初步判断是由于叶片局部失去光保护作用后, 植株处于

持续光照下引起的。对实验组进行后续的生长观察, 叶片枯萎面积占比并未继续增大, 且植株未见其他异常, 生长状态良好, 这可能与沉默效果持续时间有限以及病毒在植物体内的不均匀分布有关^[27]。但此现象出现的具体原因需今后进一步研究才能确定。

本实验构建的沉默体系对内源 *PgPDS* 基因的抑制率为 62.65%, 相较于文中提到的其他物种来讲并不高。沉默效率与多种因素有关, 首要因素就是插入片段与目的基因的同源性, 沉默效率与二者的同源性呈正相关^[28]。其次是片段的长度以及插入方向, 实验表明以靶基因反向互补序列的形式构建载体体会提高沉默效率^[29]。再者是病毒载体的选择, 不同的病毒对宿主亲和力不同, 且工作的适宜温度不同。另外, 接种方法对侵染效率有着一定的影响。人参叶片薄, 在注射接种过程中发现能够进入叶片的菌液量有限, 这可能是影响沉默效率的一个重要因素, 除注射接种法外, 现有的侵染方法还有真空渗透法^[30]、根部浸润法^[31]以及萌芽真空浸润法 (sprout vacuum-infiltration, SVI)^[32]等。李文辰等^[33]研究了不同接种方法对大豆不同组织基因沉默效率的影响, 结果显示注射方法对叶片沉默效率最高, 注射加灌根结合方法对根部沉默效率最高。今后可以验证上述方法在人参基因沉默相关研究中的可行性, 且可以根据不同的实验目的选择不同的接种方法。总之, 在后续的研究中若想提高沉默效率, 则可以从以上几个方面入手。

VIGS 技术作为一种反向遗传学技术, 具有操作简便, 成本低, 见效快等优点。在研究中无需进行突变体筛选, 且对人参这种尚无成熟组培体系的物种十分友好, 今后可以应用于人参抗病、抗逆基因以及生长发育相关基因的鉴定。最新研究发现, TGS 与 PTGS 均存在可遗传现象^[34-36], 因此 VIGS 技术还有望应用于人参育种中。随着人们对 VIGS 技术机制的研究加深, 可以逐渐解决其存在的一些弊端和不足, 如基因沉默不完全、沉默效率及表型不稳定、易受病毒侵染症状影响等^[37], 将其更好地应用于人参功能基因组学研究中。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Denli A M, Hannon G J. RNAi: An ever-growing puzzle [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(4): 196-201.
- [2] 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 [J]. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279-289.
- [3] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [4] Mansoor S, Amin I, Hussain M, *et al.* Engineering novel traits in plants through RNA interference [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(11): 559-565.
- [5] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.
- [6] Valli A A, Santos B A, Hnatova S, *et al.* Most microRNAs in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii* are produced by Dicer-like 3-mediated cleavage of introns and untranslated regions of coding RNAs [J]. *Genome Res*, 2016, 26(4): 519-529.
- [7] Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 413-420.
- [8] Qian Y X, Cheng Y, Cheng X, *et al.* Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(7): 1347-1363.
- [9] Senthil-Kumar M, Mysore K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics [J]. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(12): 656-665.
- [10] Montgomery T A, Yoo S J, Fahlgren N, *et al.* AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(51): 20055-20062.
- [11] Travella S, Klimm T E, Keller B. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(1): 6-20.
- [12] 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): 409-416.
- [13] 张丽, 袁兴帅, 李淑玲, 等. 高粱中 FoMV 诱导的基因沉默体系的构建 [J]. 分子植物育种, 2022: 1-9.
- [14] Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [15] Han J Y, In J G, Kwon Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [16] 于彦婷, 任丽, 孙春玉, 等. 人参 SQE 基因干扰载体的构建及转化 [J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(2): 121-126.
- [17] Zhao C, Xu T H, Liang Y L, *et al.* Functional analysis of β -amyrin synthase gene in ginsenoside biosynthesis by RNA interference [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(8): 1307-1315.
- [18] 王思嘉, 孙嘉莹, 刘美琦, 等. 人参 bZIP 基因家族生物信息学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2786-2794.
- [19] Jeong G T, Park D H. Mass production of transformed hairy root for secondary metabolites: A case study of *Panax ginseng* hairy roots [M]//Malik S. Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture. Cham: Springer, 2017: 183-201.
- [20] Palazón J, Mallol A, Eibl R, *et al.* Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor [J]. *Planta Med*, 2003, 69(4): 344-349.
- [21] Yu K W, Murthy H N, Hahn E J, *et al.* Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: Influence of temperature and light quality [J]. *Biochem Eng J*, 2005, 23(1): 53-56.
- [22] 侯春喜, 赵寿经, 梁彦龙, 等. 人参的遗传改良 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(9): 91-96.
- [23] 李雅淑, 李冉琪, 张宁, 等. 人参病程相关蛋白 PgPR like 基因的克隆及初步功能分析 [J]. 分子植物育种, 2023: 3: 1-10.
- [24] Manhães A M, de Oliveira M V V, Shan L B. Establishment of an efficient virus-induced gene silencing (VIGS) assay in *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated rubbing infection [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1287: 235-241.
- [25] Agüero J, Vives M D E L C, Velázquez K, *et al.* Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on *Citrus* leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and *Citrus* plants [J]. *Virology*, 2014, 460/461: 154-164.
- [26] 杨敏, 李卓, 许林, 等. 农杆菌介导的病毒侵染在茶花中的应用 [J]. 分子植物育种, 2022: 1-11.
- [27] Galipienso L, Vives M C, Navarro L, *et al.* Detection of *Citrus* leaf blotch virus using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2004, 110(2): 175-181.
- [28] Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, *et al.* Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants [J]. *Plant J*, 2004, 39(5): 734-746.

- [29] Lacomme C, Hrubikova K, Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats [J]. *Plant J*, 2003, 34(4): 543-553.
- [30] Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, *et al*. Virus-induced gene silencing in tomato fruit [J]. *Plant J*, 2005, 43(2): 299-308.
- [31] Ryu C M, Anand A, Kang L, *et al*. Agrodrench: A novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species [J]. *Plant J*, 2004, 40(2): 322-331.
- [32] Yan H X, Fu D Q, Zhu B Z, *et al*. Sprout vacuum-infiltration: A simple and efficient agroinoculation method for virus-induced gene silencing in diverse solanaceous species [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9): 1713-1722.
- [33] 李文辰, 刘鑫, 康越, 等. TRV 病毒诱导大豆基因沉默体系优化及应用 [J]. *生物技术通报*, 2023(7): 143-150.
- [34] Kanazawa A, Inaba J I, Shimura H, *et al*. Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants [J]. *Plant J*, 2011, 65(1): 156-168.
- [35] Yamagishi N, Yoshikawa N. Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(1/2): 15-24.
- [36] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(7): 797-806.
- [37] 宋震, 李中安, 周常勇. 病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 研究进展 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(9): 1885-1894.

[责任编辑 时圣明]