

• 药材与资源 •

忍冬 VIGS 基因沉默体系构建

褚洪月¹, 刘振华^{1,2}, 李 佳^{1,2}, 张永清^{1,2}, 蒲高斌^{1,2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省中药质量控制与全产业链建设协同创新中心, 山东 济南 250355

摘要:目的 以忍冬 *Lonicera japonica* 八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, *PDS*) 基因为标记基因, 利用 ZMBJ-CMV 载体建立基于病毒诱导的忍冬基因沉默体系。方法 以忍冬为材料, 通过选取同源性较高的片段设计 *PDS* 基因的特异性引物, 克隆出片段长度为 135 bp 的序列作为目的基因片段, 经双酶切后与黄瓜花叶病毒载体连接构建 VIGS 重组载体, 转化根癌农杆菌后, 侵染忍冬幼苗。此外, 还对农杆菌吸光度 (*A*) 值和侵染方法对 *PDS* 基因沉默效率的影响进行了比较。结果 被侵染植株叶片 *PDS* 基因表达水平显著降低, 叶绿素和类胡萝卜素含量显著下降, 叶片出现白化表型。结论 建立了以 ZMBJ-CMV 载体诱导的忍冬基因沉默体系, 农杆菌 *A* 值为 0.8、注射后再进行真空浸润, 能够提高忍冬目标基因的沉默效率, 为开展忍冬关键基因的功能研究提供了技术支撑。

关键词: 忍冬; *LjPDS*; VIGS; 叶绿素; 类胡萝卜素; 沉默体系

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1309-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.023

Construction of VIGS gene silencing system in *Lonicera japonica*

CHU Hongyue¹, LIU Zhenhua^{1,2}, LI Jia^{1,2}, ZHANG Yongqing^{1,2}, PU Gaobin^{1,2}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Quality Control and Construction of the Whole Industry Chain of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective The ZMBJ-CMV vector was used to establish the gene silencing system of *Lonicera japonica* based on virus induction by using the phytoene desaturase (*PDS*) gene as the marker gene. **Methods** Using *L. japonica* as the material, specific primers of *PDS* gene were designed by selecting fragments with high homologous characteristics, and the sequence length of 135 bp was cloned as the target gene fragment. After double enzyme cutting, this sequence was ligated to cucumber mosaic virus to construct VIGS recombinant vector, which was transformed to *Agrobacterium tumefaciens*. Finally, the *Agrobacterium tumefaciens* was used to infect the *L. japonica* seedlings. At the same time, the effects of *Agrobacterium tumefaciens* absorbance (*A*) value and infection method on the silencing efficiency of *PDS* gene were also compared. **Results** The expression level of *PDS* gene in the leaves of infected plants decreased significantly, and the contents of chlorophyll and carotenoid also decreased significantly. Moreover, the leaves of *L. japonica* showed albino phenotype. **Conclusion** The gene silencing system of *L. japonica* induced by ZMBJ-CMV vector was established. The *A* value of *Agrobacterium tumefaciens* was 0.8, and vacuum infiltration after injection could improve the silencing efficiency of *L. japonica* target gene. This study provides technical support for the functional study of key genes in *L. japonica*.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; *LjPDS*; VIGS; chlorophyll; carotenoid; silencing system

金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带少量初开的花, 始载于《名医别录》, 是我国传统中药材, 具有清热解毒、疏散

风热等功效^[1]。金银花市场需求巨大, 据统计有 500 多个临床组方和 200 多种中成药中都含有金银花。山东、河南、河北是金银花的主产区^[2], 目前栽培面积超过 6.7

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 山东省重点研发计划 (乡村振兴科技创新提振行动计划) 项目 (2022TZXD0036); 山东省农业良种工程项目 (2021LZGC008); 山东省现代农业产业技术体系中草药创新团队项目 (SDAIT-20)

作者简介: 褚洪月 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源学。E-mail: chuhongyue0717@163.com

*通信作者: 蒲高斌 (1979—), 男, 教授, 主要从事中药资源研究。E-mail: gbpu@163.com

万公顷,年产量3000余万千克。由于忍冬育种基础薄弱,传统育种方法周期长、效率低,导致生产中缺乏良种,严重制约了金银花产业的发展。

挖掘忍冬关键性状的决定基因,将分子标记辅助育种与传统育种方式结合,是解决忍冬生产中良种缺乏的有效途径。为此,本课题组前期从忍冬中克隆获得了 *HQT*^[3]、*C3'H*^[4]、*MLO*^[5]、*MYB*^[6]、U6 启动子^[7] 等多个与质量和抗性相关的基因。遗憾的是,由于忍冬稳定遗传转化效率极低,很多基因只能在体外或异源植株中验证功能,缺乏直接的实验证据。

病毒诱导的基因沉默具有操作简便、研究周期短、不需遗传转化等优点,已在多种单、双子叶植物中广泛应用^[8-9]。它基于植物对病毒基因复制的防御机制,综合植物病毒的非转基因系统性侵染、植物的免疫应答及细胞 RNAi 沉默机制于一体,可以简易快速且高效的沉默靶向基因,极大地方便了植物基因功能的反向遗传学研究^[10-11]。与传统的基因功能分析方法相比,病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 能够在侵染植物当代对目标基因进行沉默和功能分析,无需开发稳定的转化子,并且具有沉默单个或多个基因家族成员的潜力^[12]。

在多种植物中,黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 已被应用于 VIGS 体系的开发,包括本生烟草^[13]、菠菜^[14]、马铃薯^[15]、香蕉^[16]和玉米^[17]等。Wang 等^[18]基于天然玉米感染 CMV 株,开发了一套 CMV 玉米北京分离物 (ZMBJ-CMV) 的高效病毒诱导基因 VIGS,为玉米快速高效的基因功能研究提供了工具。Tasaki 等^[19]开发了一种基于香蕉感染 CMV 分离物 CMV 20 的 VIGS 系统,并为香蕉开发了一种高效的农杆菌接种方法,高感染率和延长的沉默将为加速香蕉的功能基因组研究提供宝贵的工具。VIGS 已成功用于多种药用植物性状功能基因的挖掘,VIGS 系统将会在更多的植物物种,尤其是在那些难以通过转基因方法分析的药用植物中得以应用^[20-22],成为后基因组时代作物基因功能研究的重要技术手段。

八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 是类胡萝卜素合成途径中的一个关键酶。沉默表达 *PDS* 基因后,类胡萝卜素合成途径受阻,进而导致叶绿素被光氧化降解,植株呈现白化现象^[23-24]。因此,*PDS* 基因被作为报告基因在 VIGS 沉默体系中普遍应用。然而,有关忍冬 VIGS 的研究目前尚未见报道。本研究以忍冬 *PDS* (*LjPDS*) 基因为切入点,通过从忍冬中克隆 *PDS* 基因,利用生物信息学分析软件对其进化关系进行分析,构建了 VIGS 体系,验证并优化了 VIGS 处理忍冬的沉默效果,为开展忍冬关键基因功能研究奠定了基础。

1 材料

选用山东中医药大学培育的忍冬新品种‘华金2号’幼苗,由山东中医药大学蒲高斌教授鉴定为忍冬 *L. japonica* Thunb.。多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 TB Green Premix Ex Taq II 均购自 TaKaRa 公司; C58C1 菌株购自上海唯地生物技术有限公司; 引物合成和测序均由铂尚生物技术(上海)有限公司负责。

2 方法

2.1 样品的处理

其在组培室中播种并培养,培养条件:温度 23 °C,光强度 110 μmol/(m²·s),光循环 16 h 光照/8 h 黑暗,湿度 60%。适合开发 VIGS 载体的病毒在植物中应具有高传染性,但症状轻微或无症状。为此选用了 Wang 等^[18]改造 CMV 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 重组构建后的 ZMBJ-CMV VIGS 载体,该载体由中国农业大学植物保护学院植物病理学系周涛研究组提供,载体最适合的插入片段大小为 100~300 bp。

2.2 *LjPDS* 基因片段的克隆

根据课题组前期的‘华金2号’全基因组测序结果,使用 Primer 6.0 选取同源性较高的片段设计 *LjPDS* 基因的特异性引物(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	引物序列 (5'-3')	用途
<i>LjPDS</i> -F	GCGGTACCTTTGGGGAGTCAATAGTTGG	<i>LjPDS</i> 基因克隆
<i>LjPDS</i> -R	GCGTCTAGAATCCCCACACACATACAATC	
CMV2F2557	AAATCTCAGACTGCTCCGC	VIGS 载体引物
CMV23R	AATGGATCCGGTCTCCTTTTGGAG	
<i>Actin</i> -F	GGATGCTTATGTCCGGTGATGAAG	内参引物
<i>Actin</i> -R	TGTTGGCTTTAGGGTTGAGAGG	
<i>qPDS</i> -F	TGGCAGTTGAAGAACCGGAA	定量引物
<i>qPDS</i> -R	TCGGAACCGGTATCTGACT	

RNA提取步骤参照试剂盒说明书。提取的RNA经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。使用TAKARA公司的PrimeScrip™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒,将合格的RNA反转录为cDNA。以上述cDNA为模板,使用北京聚合美生物科技有限公司2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix高保真Taq酶mix进行PDS基因扩增,PCR扩增体系:2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix 10 μL、上引物0.5 μL、下引物0.5 μL、cDNA 1 μL和ddH₂O 8 μL。PCR扩增程序:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,57 °C 30 s,72 °C延伸1 min,循环32次;72 °C终延伸5 min;4 °C保存。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,确定条带的正确性和单一性。然后使用胶回收试剂盒进行PCR产物回收,回收步骤参考说明书。回收产物与pMD18-T载体按照说明书的步骤和方法进行连接,并转化到DH5α感受态细胞。经抗性筛选后,挑取阳性单菌落,用引物进行PCR检测,并将阳性菌落送至铂尚生物技术(上海)有限公司测序。

2.3 LjPDS蛋白生物信息学分析

将LjPDS基因的测序结果进行生物信息学分析。首先在NCBI在线软件ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)和翻译出的蛋白序列;通过NCBI数据库的在线软件blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)寻找与LjPDS蛋白序列相似的其他物种的PDS蛋白序列并下载;DNAMAN 6.0软件对不同物种PDS蛋白序列进行多序列比对分析,找出相对保守的结构域;通过MEGA X软件对LjPDS蛋白与其他物种PDS蛋白进行系统进化树分析。

2.4 VIGS载体的构建方法

将测序正确的大肠杆菌提取质粒,采用限制性内切酶Kpn I、Xba I同时对该质粒和pCMV201-2b_{N81}质粒分别进行双酶切。将酶切后的目的片段和pCMV201-2b_{N81}载体回收,利用T4连接酶进行连接,并转化到大肠杆菌感受态细胞中。经抗性筛选后,挑取阳性单菌落,用载体引物进行PCR检测。参考Wang等^[18]实验方法,成功连入插入片段的pCMV201-2b_{N81}重组质粒经PCR扩增得到的产物大小为431 bp插入片段长度,未能成功插入片段的pCMV201-2b_{N81}质粒经PCR扩增得到的产物大小约为431 bp。PCR程序为95 °C预变性3 min;95 °C

变性30 s,55 °C、30 s,72 °C延伸90 s,循环30次;72 °C终延伸10 min。将正确插入的重组质粒转化根癌土壤杆菌C58C1。

2.5 农杆菌接种

将携带有pCMV101、pCMV201-2b_{N81}、pCMV201-2b_{N81}:LjPDS、pCMV301的根癌土壤杆菌C58C1在带有卡那霉素(质量浓度为50 μg/mL)和利福平(质量浓度为25 μg/mL)的LB培养基中28 °C、180 r/min震荡培养36 h。再以1:100的比例取新鲜菌液接种于20 mL LB液体培养基中,使根癌土壤杆菌的A₆₀₀值在0.6~1.0。4 000 r/min离心10 min收集菌体,弃上清液。使用10 mmol/L氯化镁(MgCl₂,天津市鼎盛鑫化工有限公司)、10 mmol/L MES水合物(MES,上海麦克林生化科技有限公司)、100 μmol/L乙酰丁香酮(AS,上海麦克林生化科技有限公司),加入ddH₂O至100 mL组成的侵染缓冲液,将重悬洗涤后的菌体吸光度(A)调整至A₆₀₀=1.0。室温静置诱导至少3 h。

将诱导后的分别携带有pCMV101、pCMV201-2b_{N81}:LjPDS、pCMV301的农杆菌分别以1:1:1的比例混合,用1 mL不带针头的注射器浸润接种生长适合的忍冬幼苗叶片背面。设置3个处理组:野生型忍冬为空白对照组(CK)、空载体注射为阴性对照组(pCMV201-2b_{N81})、含PDS基因的重组载体注射为实验组(pCMV201-2b_{N81}:LjPDS),每组10株,平行测定3次。注射后放置23 °C黑暗培养2 d,之后正常光照培养。

2.6 测定指标

采集接种病毒15 d后有明显白化表型症状的忍冬叶片(接种叶上一叶),提取叶片总RNA,并反转录合成cDNA,采用SYBR Green法进行qRT-PCR,分析PDS的相对表达量。选用忍冬Actin基因(NTU60495)为内参基因^[4],并设计实时荧光定量PCR引物(表1)。相对表达量按照2^{-ΔΔC_t}法进行计算,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS软件分析结果,显著性P<0.05、0.01。使用GraphPad prism软件进行作图。

为验证LjPDS沉默后叶绿素的变化情况,分别取CK和沉默处理组的等位叶3组,测定叶绿素和类胡萝卜素含量,方法参考胡黎^[25]实验。

$$\text{叶绿素 a 含量} = 13.95 \times A_{665\text{nm}} - 6.88 \times A_{649\text{nm}}$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = 24.96 \times A_{649\text{nm}} - 7.32 \times A_{665\text{nm}}$$

$$\text{叶绿素总含量} = \text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b}$$

叶绿素的含量 = (叶绿素的含量 × 提取液体积 × 稀释倍数) / 样品鲜质量

类胡萝卜素含量 = (1000 × A_{470nm} - 2.05 × 叶绿素 a 含量 - 114.8 × 叶绿素 b 含量) / 245

2.7 VIGS 体系的优化

2.7.1 菌液吸光度 采用叶片注射法，将 3 种不同 A 值 (A₆₀₀ = 0.6、0.8、1.0) 的农杆菌注入植株叶片，置于 23 °C 黑暗处理 24 h 后，转移至光照 16 h，黑暗 8 h，23 °C 继续培养，每次处理 21 株幼苗，重复 3 次。

2.7.2 接种方法 处理 1，在子叶期，用无针头注射器吸取接种液，注入植株子叶背面，置于 23 °C 黑暗处理 24 h 后，转移至光照 16 h，黑暗 8 h，23 °C 继续培养，每次处理 21 株幼苗，重复 3 次。处理 2，在子叶期，先用注射法接种，再将幼苗真空浸润法进行处理，在真空压力为 0.60 MPa 条件下静止 2 min，置于 23 °C 黑暗处理 24 h 后，转移至光照 16 h，黑暗 8 h，23 °C 继续培养，每次处理 21 株幼苗，重复 3 次。

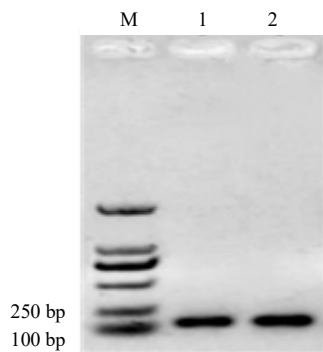
当植株出现光漂白现象后，统计光漂白植株数量，并计算 VIGS 沉默株率。以白化植株出现的百分率标记为 VIGS 的沉默株率。

植株沉默株率 = 白化株数 / 转化总株数

3 结果与分析

3.1 LjPDS 基因片段克隆

首先，本研究对 *LjPDS* 基因片段进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测，得到 1 条 135 bp 的目的条带 (图 1)，条带大小符合预期。经测序，结果显示 *PDS* 序列和参考序列一致，说明该条带是目标靶基因。



1、2-*LjPDS* 基因 PCR 产物；M-Marker。
1, 2-*LjPDS* gene PCR product; M-Marker.

图 1 忍冬 *LjPDS* PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification of *LjPDS* gene

3.2 LjPDS 生物信息学分析

本课题组前期研究已获得 *LjPDS* 全长序列。*PDS* 全长 1 458 bp，通过 NCBI 在线软件 ORF finder 分析，该基因的 ORF 为 1 458 bp，编码 485 个氨基酸。利用 MEGA X 软件对 *LjPDS* 蛋白与其他物种 *PDS* 蛋白进行系统进化树分析。结果显示 (图 2)，可以看出 *LjPDS* 与图中的植物源性都较高。利用 DNAMAN 软件将 ‘华金 2 号’ *PDS* 蛋白序列与其他几个物种 *PDS* 蛋白序列进行多序列对比，见图 3。黑色阴影表示非常保守的区域，灰色阴影表示相对保守的区域。图中黑色阴影标记氨基酸序列占大部分，*PDS* 蛋白序列 (XP_034916536.1) 与猕猴桃 *Actinidia chinensis* (PSS26226.1)、芝麻 *Sesamum indicum* (XP_011087837.1)、大豆 *Glycine max* (XP_003524753.1)、赤小豆 *Vigna umbellata* (XP_047182202.1) 和番茄 *Solanum lycopersicum* (XP_004232522.1) 蛋白序列的相似度分别为 74.95%、70.70%、70.52%、70.78% 和 69.61%，说明忍冬 *LjPDS* 与其他几个物种 *PDS* 氨基酸序列同源性非常高，其在进化发育相对保守。

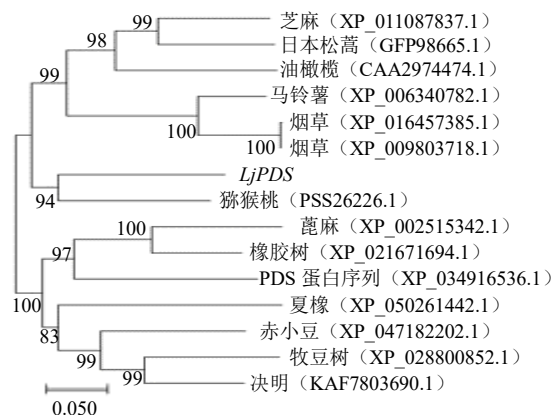


图 2 不同物种 *PDS* 蛋白遗传进化关系的分析

Fig. 2 Genetic evolutionary relationship analysis of *PDS* proteins in different species

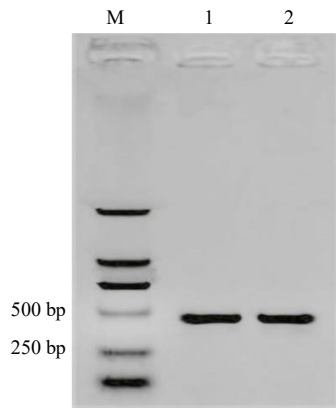
3.3 VIGS 载体的构建

将双酶切后的目的片段与载体连接，转化大肠杆菌感受态细胞。使用载体引物 PCR 检测阳性菌斑，成功连入插入片段的 pCMV201-2b_{N81} 重组质粒经 PCR 扩增得到的产物大小为 431 bp+插入片段长度 (图 4)，条带大小符合预期，说明 VIGS 载体构建成功，可用于后续实验。

LjPDS	TGVIVVGAGLAGLAAATRIITSENIPEQLLEASDAVGGRRVDAVDGFTLDRGFQIFI	111
AcPDS	TGVIVVGAGLAGLAAATRIASENIPEQLLEASDAVGGRRVDAVDGFTLDRGFQIFI	109
SiPDS	TGVIVVGAGLAGLAAATRIQSENIPEQLLEASDAVGGRRVDFVDGFTLDRGFQIFI	110
GmPDS	TGVIVVGAGLAGLAAATHINSONIPEQLLEASDAVGGRRVDFVDGFTLDRGFQIFI	105
VuPDS	TGVIVVGAGLAGLAAATHINSNNIPEVLEASDAVGGRRVDFVDGFTLDRGFQIFI	105
SIPDS	TGVIVVGGGLAGLAAATRIQADNIPEQLLEASDAVGGRRVDFVDGFTLDRGFQIFI	104
LjPDS	FSAIKSCIPVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYCPGKGLISVSIIGLYGLV	394
AcPDS	FSAEIPSCIPVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYCPGKGLISVSIIGLYGLV	386
SiPDS	FSVLSNRVDFVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYAPGKALISVSIIGLYGLV	391
GmPDS	FTANRDCIPVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYCPGKGLISVSIIGLYGLV	385
VuPDS	FTANRDCIPVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYCPGKALISVSIIGLYGLV	385
SIPDS	FSAIQGKVPVDFVLFNLGSGKGIIVNNMFFATNVAPSYAPGKALISVSIIGLYGLV	386
LjPDS	VCGDYLTSAFDGALVSGRRAVEALLKDRALVQL	485
AcPDS	ICGDYQTSATFDGALVSGRRAVEALLKDRALIPV	477
SiPDS	ICGDYVTSATFDGALVSGRRAVEALLKDRATVKV	482
GmPDS	VCGDHLTSAFDGALVSGRRAVESLLKDRALTAA	476
VuPDS	VCGDYLTSAFDGALVSGRRAVESLLKDRALTPS	476
SIPDS	ICGDYVTSATFDGALVSGKKAETLLKDKALVIV	477

图3 LjPDS 蛋白序列与其他物种同源序列比对

Fig. 3 Alignment of LjPDS protein sequence with homologous sequences from other species



1、2-pCMV201-2b_{N81}:LjPDS 大肠杆菌 DH5α 转化的鉴定
M-Marker
1, 2-pCMV201-2b_{N81}:LjPDS identification of *E. coli* DH5α transformation M-Marker

图4 阳性克隆菌落鉴定

Fig. 4 Identification of positive clonal colony

3.4 qRT-PCR 检测 PDS 基因沉默效果

利用农杆菌将 pCMV201-2b_{N81}:LjPDS 载体侵染忍冬幼苗叶片，发现当忍冬植株 PDS 基因被沉默后，植株叶片出现褪绿，白化表型，而阴性对照植株（侵染空载体）表型则没有变化（图 5），初步说明 VIGS 载体构建成功。

为进一步确定 PDS 基因的沉默效率，本研究采用 qRT-PCR 技术检测 PDS 基因的表达量。结果表明，与野生型忍冬相比，实验组 3 个单株叶片中 PDS 基因在忍冬体内的表达量显著降低，沉默效率高达 80%（图 6）。

3.5 沉默 LjPDS 基因忍冬叶片色素含量降低

通过对 CK 和沉默 LjPDS 基因有明显白化现象的忍冬叶片，研究进一步测定了 CK 和白化忍冬叶片中叶绿素及类胡萝卜素含量，发现沉默 LjPDS 会使忍冬叶片叶绿素和类胡萝卜素的含量降低，其降低的程度较为显著（图 7）。

3.6 VIGS 体系的优化

不同寄主植物中基因沉默的效率及成功率存在差异，为了更好地评价 VIGS 的沉默株率，本研究比较不同农杆菌菌液 ($A_{600}=0.60$ 、 0.80 和 1.00) 及不同的接种方法对忍冬 PDS 基因沉默株率的影响。结果显示，一定范围内农杆菌接种 (A 值为 $0.60\sim 1.00$) 对 VIGS 效率影响不明显，当农杆菌菌液 $A_{600}=0.80$ 时，PDS 基因的沉默比例最高，为 50.79% ，农杆菌 $A_{600}=0.60$ 和 $A_{600}=1.00$ 时沉默比例分别为 44.44% 和 49.20% 。结果如图 8 所示，注射法和注射真空浸润法的沉默比例分别为 50.79% 和 66.66% ，可以采用注射真空浸润法提高沉默效率。

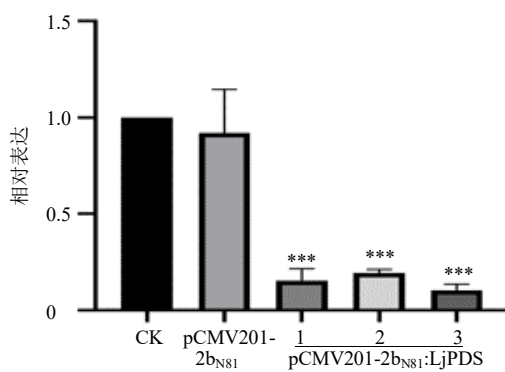
4 讨论

目前尚未发现可靠的遗传转化体系、基因沉默体系和基因敲除体系，能够使忍冬植物的再生和遗传稳定转化。然而，能够分析忍冬的重要基因功能将是进一步表征植物的重要前提。因此，本研究利用生物信息学分析和 PCR 技术构建 VIGS 载体，以期建立忍冬 VIGS 体系，为研究忍冬关键基因的功能奠定基础。



图5 VIGS瞬时沉默表达 *LjPDS* 的忍冬植株表型

Fig.5 Phenotypes of *L. japonica* plants expressing *LjPDS* with transient silencing by VIGS



1、2、3号分别为沉默组3个单株叶片 *PDS* 基因表达量, *** $P < 0.01$ 水平上存在显著差异, 下图同。
1, 2, 3 were the expression levels of *PDS* gene in the leaves of three single plants in the silencing group, respectively, *** $P < 0.01$ indicates a significant difference at the level, same as below.

图6 *LjPDS* 基因的沉默效果检测

Fig. 6 Detection of silencing efficiency of *LjPDS* gene

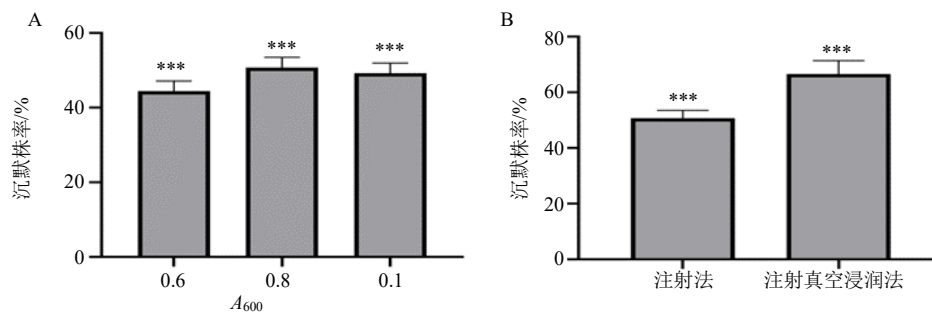


图8 农杆菌不同接种吸光度 (A) 及不同接种方法 (B) 对 *LjPDS* 基因沉默株率的影响

Fig. 8 Effects of different inoculation absorbances (A) and different inoculation methods (B) of *Agrobacterium tumefaciens* on silencing rate of *LjPDS* gene

出现白化现象, qRT-PCR 结果发现 VIGS 沉默株系中 *PDS* 基因表达量显著降低。综上, VIGS 体系可在忍冬中成功地发挥作用, 成功地沉默了忍冬 *PDS* 基因, 并获得 *PDS* 基因沉默的忍冬植株。Li 等^[26]建立了 1 个基于 CMV 的 VIGS 系统, 可以有效的沉默玉米基因, 克服了目前玉米 VIGS 病毒感染率低、沉默维持

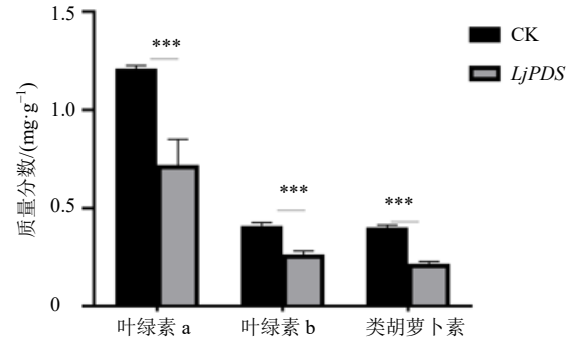


图7 沉默 *LjPDS* 叶绿素和类胡萝卜素量降低

Fig. 7 Lower chlorophyll and carotenoid contents in silent *LjPDS*

本研究通过序列比对发现忍冬科植物中 *PDS* 基因高度同源, 进而利用其保守结构域设计引物并成功克隆出用 *PDS* 基因片段, 并利用酶切连接的方法构建了 VIGS 载体, 转化到根癌农杆菌并侵染忍冬叶片,

时间短的局限性。董婷婷^[27]以 CMV-Fny 侵染性克隆为基础, 构建 2b 缺失突变载体 pCB301-Fny2-2b del, 完成对水芹 CMV-Fny 侵染性克隆的改造, 改造好的载体成功沉默水芹 *PDS* 基因。

VIGS 具有不依赖遗传转化, 接种方便, 沉默效率高的优势, 但由于 VIGS 依赖于转录后基因沉默和

转录基因沉默以及沉默信号的全身传递,不同个体、器官和组织的沉默程度不同,沉默的起始时间和持续时间也可能因个体和物种而异,因此,还需要进一步研究体系优化,使其沉默效率更加高效。尽管如此,但开发的 VIGS 方法可用于执行反向遗传方法以鉴定未知的基因功能,且实验处理组较对照组也有极显著差异,这表明本方法可以用于大规模基因沉默忍冬植物材料的制备, VIGS 可以快速有效地用于分析忍冬中的基因功能。VIGS 的成功建立可以消除组织培养的需要,为研究忍冬的基因功能提供有效的方法,加速忍冬功能基因组研究的进程。为研究忍冬基因功能引入新途径,提供创新的忍冬种质资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 236.
- [2] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [3] Pu G B, Zhou B Q, Xiang F N. Isolation and functional characterization of a *Lonicera japonica* hydroxycinnamoyl transferase involved in chlorogenic acid synthesis [J]. *Biologia*, 2017, 72(6): 608-618.
- [4] Pu G B, Wang P, Zhou B Q, et al. Cloning and characterization of *Lonicera japonica* p-coumaroyl ester 3-hydroxylase which is involved in the biosynthesis of chlorogenic acid [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(7): 1403-1409.
- [5] 李小丽, 魏丽, 刘谦, 等. 金银花 MLO 家族全基因组序列鉴定及表达分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(10): 2867-2875.
- [6] 唐志强, 许小涵, 刘谦, 等. 忍冬干旱胁迫响应 MYB 转录因子的筛选及表达 [J]. 分子植物育种. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220629.1214.014>.
- [7] 许小涵, 李小丽, 唐志强, 等. 忍冬 U6 启动子的克隆及功能验证 [J]. 药学学报, 2022, 57(4): 1187-1192.
- [8] Rössner C, Lotz D, Becker A. VIGS goes viral: How VIGS transforms our understanding of plant science [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2022, 73: 703-728.
- [9] Dommes A B, Gross T, Herbert D B, et al. Virus-induced gene silencing: Empowering genetics in non-model organisms [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(3): 757-770.
- [10] Wang M, Gao S L, Zeng W Z, et al. Plant virology delivers diverse toolsets for biotechnology [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1338.
- [11] Jagram N, Dasgupta I. Principles and practice of virus induced gene silencing for functional genomics in plants [J]. *Virus Genes*, 2023, 59(2): 173-187.
- [12] Kumar G, Kumari K, Dasgupta I. RTBV-based VIGS vector for functional genomics in rice: Methodology, advances, challenges, and future implications [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2408: 117-131.
- [13] Otagaki S, Arai M, Takahashi A, et al. Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector [J]. *Plant Biotechnol*, 2006, 23(3): 259-265.
- [14] Kim H, Onodera Y, Masuta C. Application of cucumber mosaic virus to efficient induction and long-term maintenance of virus-induced gene silencing in spinach [J]. *Plant Biotechnol*, 2020, 37(1): 83-88.
- [15] Ntui V O, Kynet K, Azadi P, et al. Transgenic accumulation of a defective cucumber mosaic virus (CMV) replicase derived double stranded RNA modulates plant defence against CMV strains O and Y in potato [J]. *Transgenic Res*, 2013, 22(6): 1191-1205.
- [16] Tzean Y, Lee M C, Jan H H, et al. *Cucumber mosaic virus*-induced gene silencing in banana [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11553.
- [17] Zhou T, Liu X D, Fan Z F. Use of a virus gene silencing vector for maize functional genomics research [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1676: 141-150.
- [18] Wang R, Yang X X, Wang N, et al. An efficient virus-induced gene silencing vector for maize functional genomics research [J]. *Plant J*, 2016, 86(1): 102-115.
- [19] Tasaki K, Terada H, Masuta C, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Lilium leichtlinii* using the *Cucumber mosaic virus* vector [J]. *Plant Biotechnol*, 2016, 33(5): 373-381.
- [20] Patra B, Liu Y L, Singleton J J, et al. Virus-induced gene silencing as a tool to study regulation of alkaloid biosynthesis in medicinal plants [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2469: 155-164.
- [21] Bomzan D P, Kumar K, Kumar S R, et al. Virus-induced gene silencing for functional genomics of specialized metabolism in medicinal plants [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2408: 147-163.
- [22] Schachtsiek J, Hussain T, Azzouhri K, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Cannabis sativa* L [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 157.
- [23] 李瑞雪, 王钰婷, 胡飞, 等. 桑树 PDS 基因 VIGS 转化体系的构建与鉴定 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(7): 1432-1438.
- [24] Naing A H, Kyu S Y, Pe P P W, et al. Silencing of the phytoene desaturase (*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 110.
- [25] 胡黎. 沉默 PhPDS 基因对矮牵牛生长发育的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [26] Li H G, Zhang D F, Xie K, et al. Efficient and high-throughput pseudorecombinant-chimeric *Cucumber mosaic virus*-based VIGS in maize [J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(4): 2865-2876.
- [27] 董婷婷. 水芹病毒诱导的基因沉默载体的构建与应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.

[责任编辑 时圣明]