

病毒诱导的基因沉默技术用于植物色素代谢机制的研究进展

潘多^{1,2}, 张嵩玥^{1,2}, 刘芳伊³, 田清尹^{1,2}, 杨秀莲^{1,2}, 王良桂^{1,2}, 岳远征^{1,2*}

1 南京林业大学风景园林学院, 江苏 南京 210037

2 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037

3 大千生态环境集团股份有限公司, 江苏 南京 210036

潘多, 张嵩玥, 刘芳伊, 田清尹, 杨秀莲, 王良桂, 岳远征. 病毒诱导的基因沉默技术用于植物色素代谢机制的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2579-2599.

PAN Duo, ZHANG Songyue, LIU Fangyi, TIAN Qingyin, YANG Xiulian, WANG Lianggui, YUE Yuanzheng. Application of virus-induced gene silencing technology to investigate the phytochrome metabolism mechanism: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2579-2599.

摘 要: 色彩是评价园艺植物观赏性状的重要指标, 而植物色素是影响植物色彩表型的关键因子。植物色素及其代谢产物在植物观赏器官颜色形成、植株生长发育调节及对逆境胁迫的响应等方面发挥着重要的作用, 是植物研究领域长期关注的热点问题。病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是利用植物同源依赖性防御机制, 特异性降低宿主内源性基因表达的一种重要基因组学工具, 能够通过快速诱导植物基因沉默表型的产生, 表征基因的功能, 为缺乏遗传转化体系的植物的基因功能鉴定提供高效可行的替代方案。本文综述了 VIGS 技术在植物色素的生物合成、降解和调控机制上的应用现状, 并探讨了 VIGS 技术在探究色素调控机制上的潜力和未来前景, 以期进一步完善对不同植物色素的代谢过程和调控机制的理解, 为改良植物色彩性状提供参考依据。

关键词: 病毒诱导的基因沉默; 植物色素; 代谢调控; 病毒诱导的基因沉默(VIGS)衍生技术

资助项目: 国家自然科学基金(32071828); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 盐碱地园林植物选育及产业化应用研究

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071828), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD), and the Research on Core Technology of Selection and Breeding of Saline Garden Plants and Industrial Application.

*Corresponding author. E-mail: yueyuanzheng@njfu.edu.cn

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-04-19; Published online: 2023-04-25

Application of virus-induced gene silencing technology to investigate the phytochrome metabolism mechanism: a review

PAN Duo^{1,2}, ZHANG Songyue^{1,2}, LIU Fangyi³, TIAN Qingyin^{1,2}, YANG Xiulian^{1,2},
WANG Lianggui^{1,2}, YUE Yuanzheng^{1,2*}

1 College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

2 Co-Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

3 Daqian Ecological Environment Group Co., Ltd., Nanjing 210036, Jiangsu, China

Abstract: Color is an important indicator for evaluating the ornamental traits of horticultural plants, and plant pigments is a key factor affecting the color phenotype of plants. Plant pigments and their metabolites play important roles in color formation of ornamental organs, regulation of plant growth and development, and response to adversity stress. It has therefore become a hot topic in the field of plant research. Virus-induced gene silencing (VIGS) is a vital genomics tool that specifically reduces host endogenous gene expression utilizing plant homology-dependent defense mechanisms. In addition, VIGS enables characterization of gene function by rapidly inducing the gene-silencing phenotypes in plants. It provides an efficient and feasible alternative for verifying gene function in plant species lacking genetic transformation systems. This paper reviews the current status of the application of VIGS technology in the biosynthesis, degradation and regulatory mechanisms of plant pigments. Moreover, this review discusses the potential and future prospects of VIGS technology in exploring the regulatory mechanisms of plant pigments, with the aim to further our understandings of the metabolic processes and regulatory mechanisms of different plant pigments as well as improving plant color traits.

Keywords: virus-induced gene silencing (VIGS); plant pigments; metabolic regulation; virus-induced gene silencing (VIGS)-derived technology

随着基因组和表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 测序技术的发展, 植物遗传信息的获得变得更加便捷, 但基因功能的鉴定仍然依赖于有效的功能评估方法。遗传转化通常是鉴定基因功能的先决条件, 但在一部分植物中, 由于难以确定快速有效的转化方法, 无法得到大量转基因植物而验证基因功能。对于缺乏稳定的本原遗传转化体系的植物, 基因功能只能依赖于在异源宿主中的瞬时或稳定的过表达来验证。然而有时基因在异源宿主中并不能显示出其保守功能, 从而导致实验结果具有误导性^[1]。病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 系统使

用病毒作为基因表达载体, 能够规避复杂的转化方法, 在植物中有效地敲低内源基因的表达, 因此被广泛应用于植物代谢、生长发育调控等多个领域的研究。VIGS 技术可以应用于基于各种组学的正向遗传筛选, 也可以与源自差减 cDNA 文库的测序技术相结合, 通过观察 VIGS 导致的基因功能丧失表型初步确定参与各种途径的基因, 从而实现基因的高通量表型筛选和功能鉴定^[2]。

植物色素赋予了不同的植物以多样的颜色, 同时在参与调节植物的光合作用、作为视觉或嗅觉引诱剂吸引动物授粉和散布种子、产生植物激素类次级代谢产物调节植物生长等方面也发挥着至关重

要的作用^[3]。鉴于色素物质对于植物的重要生物学意义,本文综述了VIGS技术在类胡萝卜素、花青素、甜菜素和叶绿素4种植物色素的代谢途径和调控机制研究上的应用,以期阐明VIGS技术在表征不同植物色素代谢通路各结构基因的功能、揭示植物色素调控机制上的应用潜力,为控制植物重要色彩性状、优化园艺植物育种提供参考。

1 VIGS的分子机制

1.1 病毒诱导的转录后沉默

首先,病毒基因组(以RNA病毒为例)通过合适的接种方法递送入植物宿主细胞内,整合到宿主基因组中。然后,包含RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerases, RDRP)的复制酶复合体将单链RNA(single-stranded RNA, ssRNA)病毒模板翻译成不同的病毒蛋白,产生双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)并引发链式反应。宿主植物编码的RNase III家族特异性核酸内切酶Dicer类似物(dicer-like, DCL)识别并切割dsRNA,形成21–24 nt成熟的短干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)双链体,参与指导、维持和传播整个植物组织的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)过程^[4]。剪切后产生的siRNA/siRNA*双链在Argonaute家族蛋白AGO1的可变N端解旋成2条siRNA单链,其中siRNA*作为乘客链弹射排除后降解,而向导链siRNA与AGO1蛋白组装并联合其他辅因子一起形成RNA诱导沉默效应复合体(RNA-induced silencing effect complex, RISC)^[5]。向导链能够识别靶转录本,RISC在向导链的引导作用下介导细胞质中的内源性靶mRNA的裂解或切割,即实现特异性PTGS^[6]。同时,siRNA可以在相邻的胞间穿梭进行短程转运,或经宿主编码的RNA依赖性RNA聚合

酶(RDRP)扩增后放大信号,再通过植物组织中的韧皮部实现长距离运输,触发未感染组织中目的基因的转录剪切或翻译抑制^[7](图1A)。

1.2 病毒诱导的转录水平的沉默

VIGS介导的另一种沉默机制是通过将植物基因启动子序列片段插入病毒载体(以DNA病毒为例)的多克隆位点中,再由农杆菌(*Agrobacterium*)递送至宿主细胞核内。病毒基因组通过滚环式复制解包并制备成ssRNA病毒模板,再通过植物特异性RNA聚合酶RNA Pol II双向转录其开放阅读框合成dsRNA。dsRNA经DCL3识别并被剪切成24 nt的siRNA双链^[8],甲基化酶HEN1(hua enhancer 1)在其3'末端的2'OH位置加上1个甲基基团修饰以避免在核酸降解酶的作用下尿苷化降解。随后经甲基化的siRNA被加载至细胞质中的AGO4蛋白上形成RISC再转运入细胞核,招募DNA甲基化转移酶特异性催化靶mRNA的启动子失活,从而实现转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)^[9](图1B)。

2 VIGS技术在类胡萝卜素代谢研究中的应用

类胡萝卜素是一类亲脂性四萜类化合物,其大量积累有助于植物花、果实和其他器官显示出特征性的黄色、橙色或红色^[10]。VIGS技术在表征植物中胡萝卜素相关基因功能上已得到了初步应用(图2A)。

2.1 类胡萝卜素前体物质合成

牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS, 由GGPPS编码)是催化甲基赤藓糖醇(methyl erythritol phosphate, MEP)途径产物合成类胡萝卜素直接代谢前体物质牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)的关键酶^[11]。CaSSUII是朝天椒(*Capsicum annuum* var.

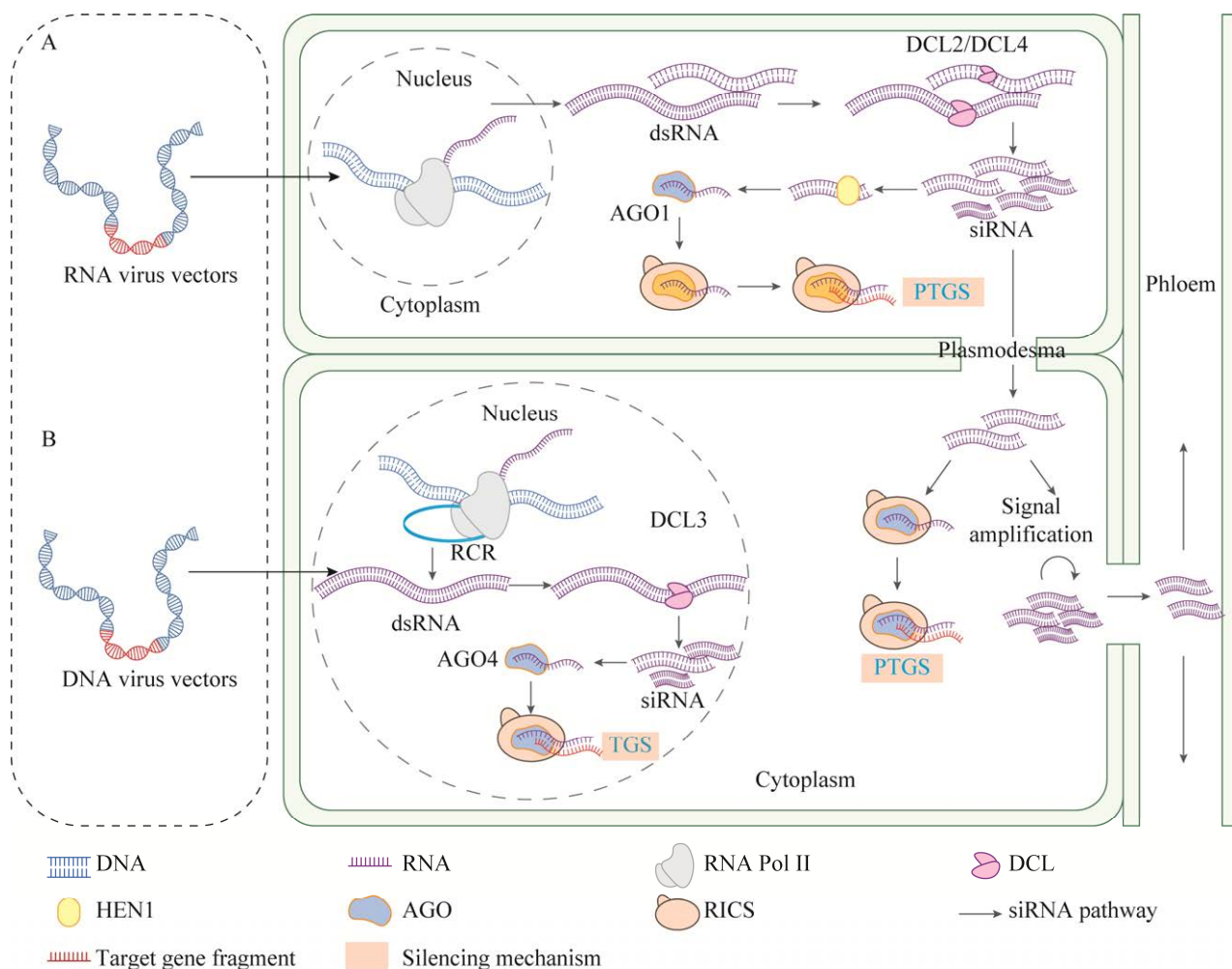


图1 VIGS的分子机制^[4] A: RNA病毒介导的PTGS. B: DNA病毒介导的TGS

Figure 1 Molecular mechanism of VIGS^[4]. A: RNA virus-mediated PTGS. B: DNA virus-mediated TGS.

conoides)中的GGPPs小亚基同系物蛋白,通过TRV-VIGS系统抑制成熟果实中的*CaSSU1*表达,导致与红色的对照组相比,*CaSSU1*-VIGS株系果实显示出明显的绿色表型中类胡萝卜素含量显著降低^[12]。

2.2 类胡萝卜素合成

首先,八氢番茄红素合酶(phytoene synthase, PSY, 由*PSY*编码)催化2种GGPP在质体中缩合,形成无色的15-顺式-八氢番茄红素(图2A)。PSY通过与质体中其他消耗GGPP的酶竞争调节类胡萝卜素生物合成的代谢流量,其活性决定了类胡萝卜素合成水平,因此,*PSY*的下调会妨碍类胡萝卜素

累积,并影响质体发育和叶绿素的生物合成^[13]。沉默陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)中*GhPSY*的表达会导致具有红叶表型的棉花叶片变绿^[14];番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中*SlPSY1*在果实“破色期”阶段显著上调,并在成熟阶段维持高水平的转录,*SlPSY1*的沉默会导致线性类胡萝卜素显著下调,果实不能正常变红而呈现为黄色^[15]。

随后,八氢番茄红素经过4步连续的酶促反应被修饰成红色的全反式番茄红素,这一过程由八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS, 由*PDS*编码)启动。15-顺式-八氢番茄红素在PDS的2步脱氢作用下,转化为9,15,9'-三顺式- ζ -胡

胡萝卜素, 这一步骤的扰动会损害下游类胡萝卜素的生物合成, 导致植物叶绿素类色素失去类胡萝卜素的光保护作用而降解产生“光漂白”现象^[16]。*PDS* 在水稻(*Oryza sativa* L.)^[17]、番茄^[15]等多种单子叶或双子叶植物中的沉默都会导致植物新发育的器官组织产生褪色甚至是白化的表型。 ζ -胡萝卜素异构酶(ζ -carotene isomerase, Z-ISO, 由 *ZISO* 编码)是异构化 *PDS* 产物的关键酶, 番茄中 *SIZISO* 的沉默导致番茄果实中番茄红素大量减少, 上游类胡萝卜素的代偿性增加, 果皮呈现淡红色表型^[15]。9,9'-二顺式-番茄红素在 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -carotene desaturase, ZDS, 由 *ZDS* 编码)的脱氢和类胡萝卜素异构酶(carotene isomerase, CRTISO, 由 *CRTISO* 编码)反转顺式双键后转化为红色的全反式番茄红素。*ZDS* 和 *CRTISO* 基因的功能丧失可导致叶绿素和类胡萝卜素的浓度比例发生改变^[18]。花菱草(*Eschscholzia californica* Chamisso)中, *EcaZDS* 的沉默使花瓣中总类胡萝卜素含量降低 16 倍, 作为 *EcaZDS* 底物的 ζ -胡萝卜素得到积累, 花瓣由橘黄转变为白黄^[19]。沉默白花甘蓝(*Brassica oleracea* var. *albiflora* Kuntze)中 *BoaCRTISO* 基因的转录, 会导致类胡萝卜素合成相关基因的表达下调, 叶黄素和总类胡萝卜素含量降低^[20]。

线性的番茄红素在碳链末端环化启动了类胡萝卜素合成途径的分支, 番茄红素 ϵ -环化酶(lycopene ϵ -cyclase, ϵ -LCY, 由 *LCYE* 编码)介导碳流入 ϵ -分支中参与 α -胡萝卜素合成, 而番茄红素 β -环化酶(lycopene β -cyclase, β -LCY, 由 *LCYB* 编码)则将碳通量导向 β -分支中合成 β -胡萝卜素^[16]。烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中 *Nte-LCY1* 和 *Nte-LCY2* 的沉默导致 β -分支类胡萝卜素的增加和 α -分支类胡萝卜素含量的降低^[21]; 枇杷(*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.)中编码色质体特异性番茄红素 β -环化酶的基因 *EjCYC-B* 的沉默导致枇杷中类胡萝卜素积累减少, 从而改

变枇杷果皮颜色^[22]; TRV-VIGS 单独沉默辣椒(*Capsicum annuum* L.)中 *CaLCYB* 基因或共沉默 *CaPSY/CaLCYB* 2 个基因导致辣椒红素的含量显著降低, 果实颜色由红色变为黄色^[23]。 α -胡萝卜素的 β 环和 ϵ 环在 ϵ 环羟化酶(ϵ -ring hydroxylase, ϵ -OHase)的作用下羟基化产生叶黄素, β -胡萝卜素在 β -环羟化酶(β -ring hydroxylase, β -OHase)和玉米黄质环氧酶(zeaxanthin epoxidase, ZEP)等不同的羟基化酶和环氧化酶的催化下产生 β 分支中的各种叶黄素(例如 β -隐黄质和辣椒红素等)^[11]。中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)中 β -OHase 由基因 *AcBCHI* 编码, *AcBCHI* 的沉默导致猕猴桃果肉中玉米黄质、叶黄素和 β -隐黄质含量降低, β -胡萝卜素含量增加^[24]。

2.3 类胡萝卜素降解

在植物中, 特异性类胡萝卜素裂解加氧酶(carotenoids cleave oxygenases, CCO, 由 *NCEDs* 和 *CCDs* 编码)可以催化特定的类胡萝卜素双键氧化裂解, 产生具有生物活性的植物激素(独脚金内酯、脱落酸)、挥发性化合物(β -紫罗兰酮)或色素类化合物(β -柠乌素、藏红花素)^[25]。沉默簇生椒[*Capsicum annuum* var. *fasciculatum* (Sturt.) Irish]中的 *CaNCED1* 和 *CaNCED3*, 导致果实比对照组提早 3 周着色, β -胡萝卜素分支中各种物质的积累增加^[26]。番茄中 *SINCE1* 的转录水平下调 81% 后, 果实中脱落酸(abscisic acid, ABA)浓度降低, 果实成熟减慢且不能完全变红、变软^[27]; 桃(*Prunus persica* L.)的白瓢突变体比黄瓢品种具有更低水平的类胡萝卜素和更高水平的降异戊二烯挥发物, 2 个品种果肉颜色的差异被认为与 *CCD4* 的功能活性有关。沉默白瓢桃中的 *PpCCD4* 基因后, 果肉的沉默区域出现黄色色素沉着, 且 β -胡萝卜素、叶黄素含量增加^[28]。

2.4 类胡萝卜素代谢转录调控

转录调控是控制类胡萝卜素代谢途径中靶

结构基因活性,调节胡萝卜素积累的核心,目前 VIGS 技术在类胡萝卜素代谢转录调控中的应用主要集中在番茄与辣椒 2 种典型的模式植物上(图 3A)。

植物果实的颜色变化往往与它们的成熟机制紧密相关,而激素信号在果实的成熟过程中起着关键的作用。番茄中,WRKY 家族中的乙烯响应型转录因子(transcription factors, TFs) SIWRKY16/17/31/33 能够与 *SIPSY1* 的启动子结合,而 SIWRKY22/25/54 与 *SIPDS* 的启动子结合, *SIWRKYs* 的沉默导致番茄果实表现出明显的着色不均匀表型^[29]; MADs-box 家族的转录因子 LeRIN 能够调节乙烯依赖性和非依赖性成熟途径相关的结构基因并直接靶向 *PSY*、*ZDS* 和 *CRTISO*, *LeRIN* 的沉默导致 *LeRIN*-VIGS 株系番茄果实的沉默区域始终保持绿色表型,而对照株系则完全变红^[30]; *RIN* 的突变会抑制果实的成熟,番茄中 *RIN* 突变产生的 *SIRIN-MC* 能激活 *SIPSY2* 的表达而抑制 *SIPSY1* 的表达,在果实色素积累中起负调控作用, *SIRIN-MC* 基因的沉默会加速突变体番茄的成熟,产生浅红色斑块^[31];辣椒中的 R-R 型 MYB 转录因子 *DIVARICATA1* 可以通过调节脱落酸的合成,促进辣椒素的积累, *CaPSY* 和 *Ca β -CHI* 的启动子能够被 *DIVARICATA1* 强烈激活,沉默 *DIVARICATA1* 的表达可显著延迟辣椒着色,同时类胡萝卜素生物合成相关基因在 *DIVARICATA1*-VIGS 株系中也显著下调^[32]。

除了激素的调节作用外,光也是控制番茄成熟的重要信号。光响应因子 PIF1a 通过结合 *SIPSY1* 启动子中的 PBE box 元件抑制 *SIPSY1* 的转录,负调节番茄果实中类胡萝卜素的积累,沉默 *SIPIF1a* 后,可检测到与邻近的非沉默组织相比, *PIF1a* 沉默的果皮组织中 *SIPSY1* 被上调^[33]。一些 NAC 家族的转录因子也被报道参与番茄果实成熟的调节。*SINOR-like1* 直接上调 *SIGGPS2*

的转录,促进番茄果实着色, *SINOR-like1* 的沉默导致 *SINOR-like1*-VIGS 株系的果实中表现出强烈的成熟抑制表型,果实呈现绿橙色相间的斑块状着色^[34]。

3 VIGS 技术在花青素代谢研究中的应用

花青素作为植物中的一种水溶性多酚类色素,常赋予植物的花、叶、果实等器官以紫色和蓝色^[35]。在草本和木本植物中,已有许多花青素代谢相关基因的功能被报道并通过 VIGS 技术得到进一步鉴定(图 2B)。

3.1 花青素前体物质合成

在苯丙氨酸氨基水解酶(phenylalanine aminohydrolase, PAL, 由 *PAL* 编码)启动的 3 步酶促反应下,苯丙氨酸经历脱氨、羟基化形成对香豆酸,再通过添加辅酶 A 转化为香豆酰辅酶 A,为花青素的合成提供前体代谢底物^[36]。沉默辣椒中 *CaPAL* 基因的表达,可导致 *CaPAL*-VIGS 株系的新生叶片中 *CaPAL* 以及其他与花青素合成相关的基因活性降低,花青素积累显著减少,叶片表现出完全的绿色,而对照组叶片中的一部分区域则依然保持紫红色^[37]。

3.2 花青素合成

查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS, 由 *CHS* 编码)是一种聚酮合酶,以 1 分子对香豆酰辅酶 A 作为起始底物,3 分子丙二酰辅酶 A 作为扩展单元,催化黄色的中间产物 4'-羟基查尔酮的形成,为下游花色苷的合成提供基本骨架^[38]。*CHS* 是导致在植物中产生类黄酮的分支,调节花青素代谢通量的第 1 个限速酶, *CHS* 活性的丧失会直接影响植物花色素的合成,改变植物器官的颜色。沉默毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.)红色花瓣中的 *AeCHS* 基因,导致花瓣出现“漂白”表型,花青素含量显著降低^[39];沉默杂

交非洲菊 (*Gerbera jamesonii* Bolus) 中的 *GCHS1/4*, 使 *GCHS1/4* 的表达下调至对照株系的 70%–80%, 导致沉默系植株黄酮类物质含量减少, 花瓣变成乳白色^[40]。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI, 由 *CHI* 编码)是一种关键的分支点酶, 能够可逆地催化二环查耳酮分子内环化为无色的三环黄烷酮。桑树(*Morus alba* L.)中 *MmCHI1* 和 *MmCHI2* 的沉默均导致花青素的含量显著降低^[41]。

黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H, 由 *F3H* 编码)羟基化黄烷酮为二氢山奈酚, 进一步在 2 种羟化酶(F3'H 和 F3'5'h)的作用下分支形成二氢槲皮素和二氢杨梅素^[36]。沉默棕色品种棉花中的 *GhF3H*、*GhF3'H* 和 *GhF3'5'h* 这 3 个基因的表达, 棉花纤维颜色不同程度地变浅, 其中 *GhF3H* 的下调对表型的影响最明显^[42]。沉默大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 中的 *sF3'H1* 基因, 导致柔毛期大豆种荚柔毛的色素沉着被抑制, 槲皮素和山奈酚的相对含量较对照组更低^[43]。

3 种羟化酶的产物通过二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol reductase, DFR, 由 *DFR* 编码)还原形成不稳定的无色花青素中间体^[38]。沉默玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)中的 *RhDFR1*, 使 *RhDFR1* 转录水平比对照降低约 70%, 导致花瓣出现“漂白”症状^[44]。无色花青素经过花青素合成酶(anthocyanin synthetase, ANS, 由 *ANS* 编码)加氧转变成 2-黄烷-3,4-二醇, 也可以通过无色花青素还原酶(leucoanthocyanin reductase, LAR)还原形成 2,3-反式黄烷-3-醇^[38]。诱导高丛越橘(*Vaccinium corymbosum* L.)中 *VcANS* 的沉默, 导致 *VcANS*-VIGS 株系与对照株系相比花青素积累减少, 果皮表现出因缺乏色素沉着导致的“漂白”表型^[45]; 沉默瓜叶菊(*cineraria*)中的 *ScANS* 基因后, 植物花青素的生物合成受到抑制, 出现叶片褪色、花瓣着色面积减少等表型^[46]。

在黄酮类 3-O-葡萄糖基转移酶(flavonoids 3-O-glucosyltransferases, UFGT, 由 *UFGT* 编码)、花青素酰基转移酶(acyltransferases, AT)、甲基转移酶(methyltransferases, MT)的糖基化、酰化、甲基化作用下有色花青素转化为各种稳定花青素苷, 经花青素转运蛋白(glutathione S-transferase, GST)转运后储存在液泡中^[47]。*LcUFGT1* 在荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)果皮红色形成中起关键作用, 在荔枝果皮“破色”前抑制 *LcUFGT1* 的转录活性将减缓果皮的色素沉着^[48]; *Rrgt1* 和 *Rrgt2* 的糖基化在玫瑰红色类花青素生物合成中起关键作用, 沉默玫瑰中编码糖基转移酶的基因 *RrGT1* 和 *RrGT2*, 均能使玫瑰花瓣红色变浅, 花青素减少^[49-50]。2-黄烷-3,4-二醇还可以被花青素还原酶(anthocyanidin reductase, ANR)还原成 2,3-顺式黄烷-3-醇作为原花青素合成底物。沉默葡萄(*Vitis vinifera* L.)果实中的 *VvANR* 基因使 *VvANR* 表达极显著下降, 导致 ANR 酶活性降低而 ANS 酶活性升高, 黄烷-3-醇积累下降而花青素积累上升, 果实提前变红且颜色变深^[51]。

3.3 花青素代谢调控

花青素合成主要受到 MYB、bHLH、Wd-40 和 b-ZIP 4 种转录因子的调控(图 3B)。上游花青素生物合成基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 主要受 R2R3-MYB 家族转录因子调节。蝴蝶兰属(*Phalaenopsis* spp.)植物中 R2R3-MYB 家族的 *PeMYB4L* 转录因子能靶向 *PeCHS* 中的 MYBST1 结合位点直接激活 *PeCHS* 的转录, 沉默 *PeMYB4L* 导致 *PeMYB4L*-VIGS 株系与对照株系相比, 花瓣、萼片和花唇部甚至是雌蕊的颜色减淡, 花青素含量降低^[52]; 黑果越桔(*Vaccinium myrtillus* L.)中 *VmMYBPA1.1* 转录因子可以激活花青素生物合成途径中关键结构基因 *VmF3'5'H* 的转录活性, 沉默黑果越桔中 *VmMYBPA1.1* 的

表达,会抑制黑果越桔中飞燕草素的积累,产生具有绿色斑块的嵌合果实,同时使 *VmCHS*、*VmF3'5'H* 等基因的表达显著下调^[53]。

下游基因 *DFR*、*ANS*、*UFGT* 受 WD-40、R2R3-MYB 和 bHLH 转录因子复合物的调节^[54];百合(*Lilium brownii* F.E.Brown)中 *LvMYB5* 转录因子可以和 *LvANS* 启动子特异性顺式作用元件结合正向调控花青素的积累,*LvMYB5* 在花瓣中沉默后,沉默株系的花瓣显示出漂白表型而对照组的花瓣颜色没有明显变化^[55];瓜叶菊中 *ScGST3* 的启动子可以被 *ScMYB3* 激活影响花色苷的转运,*ScMYB3* 的沉默引起瓜叶菊叶片出现褪色表型,包括 *ScGST* 在内的 6 个参与花青素合成、转运相关的基因表达受到抑制^[56]。

光信号是调节花青素合成的关键环境因素,而 b-ZIP 转录因子家族中的 HY5 是调节光信号的中枢调节剂^[57]:在草莓(*Fragaria×ananassa* Duch.)中 bHLH 家族的光响应因子 *FvbHLH9* 可以和 *FvHY5* 形成转录复合物特异性结合 *FvDFR* 的启动子,调节花青素的合成,干扰深色草莓栽培品种中 *FvbHLH9* 和 *FvHY5* 的表达,会抑制草莓果实红色沉积^[58];辣椒中 *CaHY5* 直接激活 *CaF3H*、*CaF3'5'H*、*CaDFR*、*CaANS* 和 *CaGST* 的启动子活性,调控花青素的生物合成和转运从而控制辣椒下胚轴中花青素的积累,*CaHY5* 的沉默直接导致 *CaHY5-VIGS* 株系紫色下胚轴被漂白,花青素的含量降低约 4 倍^[59]。

4 VIGS 在甜菜素代谢研究中的应用

甜菜素是酪氨酸衍生的天然糖苷色素,能够将植物器官染成黄色、红色或紫色且不与花青素共存^[60]。由于甜菜素通常仅存在于石竹目的几个科中,因此 VIGS 技术在甜菜素代谢中的应用主要

集中在甜菜、火龙果等石竹目的植物中(图 2C)。

4.1 甜菜素合成

甜菜素来源于莽草酸途径,在细胞质和内质网中合成,酪氨酸通过酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, Tyh OHase)的羟基化反应转化为左旋多巴(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)。细胞色素 P450 型酶 CYP76AD1、CYP76AD5 和 CYP76AD6 被证明具有酪氨酸羟化活性,其中 CYP76AD1 不仅能催化酪氨酸转化为 L-DOPA 也能氧化 L-DOPA 产生环多巴^[61]。当具红叶苋菜(*Amaranthus tricolor* L.)中的 *AtriCYP76AD1* 基因被沉默后,*AtriCYP76AD1*、*AtriCYP76AD6* 和 *AtriCYP76AD5* 的转录水平均显示出降低,植株新萌发的叶柄和叶片呈绿色,甜菜红素积累明显减少而 L-DOPA 积累增加^[62]。*CYP76AD1* 的同系物在植物中具有功能冗余,甜菜(*Beta vulgaris* L.)中 *CYP76AD6* 的单独沉默没有导致任何可见的表型,*BvCYP76AD1* 的沉默使叶片变为黄色,只有当 *BvCYP76AD6* 和 *BvCYP76AD1* 共沉默时才导致甜菜出现绿色表型^[63]。

L-DOPA 内的二羟基苯丙氨酸环被 4,5-多巴双加氧酶(4,5-DOPA-dioxygenase, Doda, 由 *DODA* 编码)裂解,产生 4,5-开环多巴中间体,然后经历自发的分子内缩合产生甜菜醛氨酸^[61]。分别沉默甜菜中 *BvDODA1* 和 *BvDODA2* 这 2 个基因的表达,其中 *BvDODA1* 的下调导致甜菜素的色素沉着丧失,叶柄和叶子变为白色,而 *BvDODA2* 的沉默不会导致表型的改变^[64]。L-DOPA 也可以被 CYP76AD1 催化氧化成多巴醌,然后环化形成甜菜素合成的关键前体环多巴。甜菜醛氨酸自发地与环多巴的亚氨基结合形成甜菜红素前体甜菜红素配基,然后被葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GT, 由 *GTs* 编码)糖基化为甜菜苷或千日红苷;与氨基酸的亚氨基

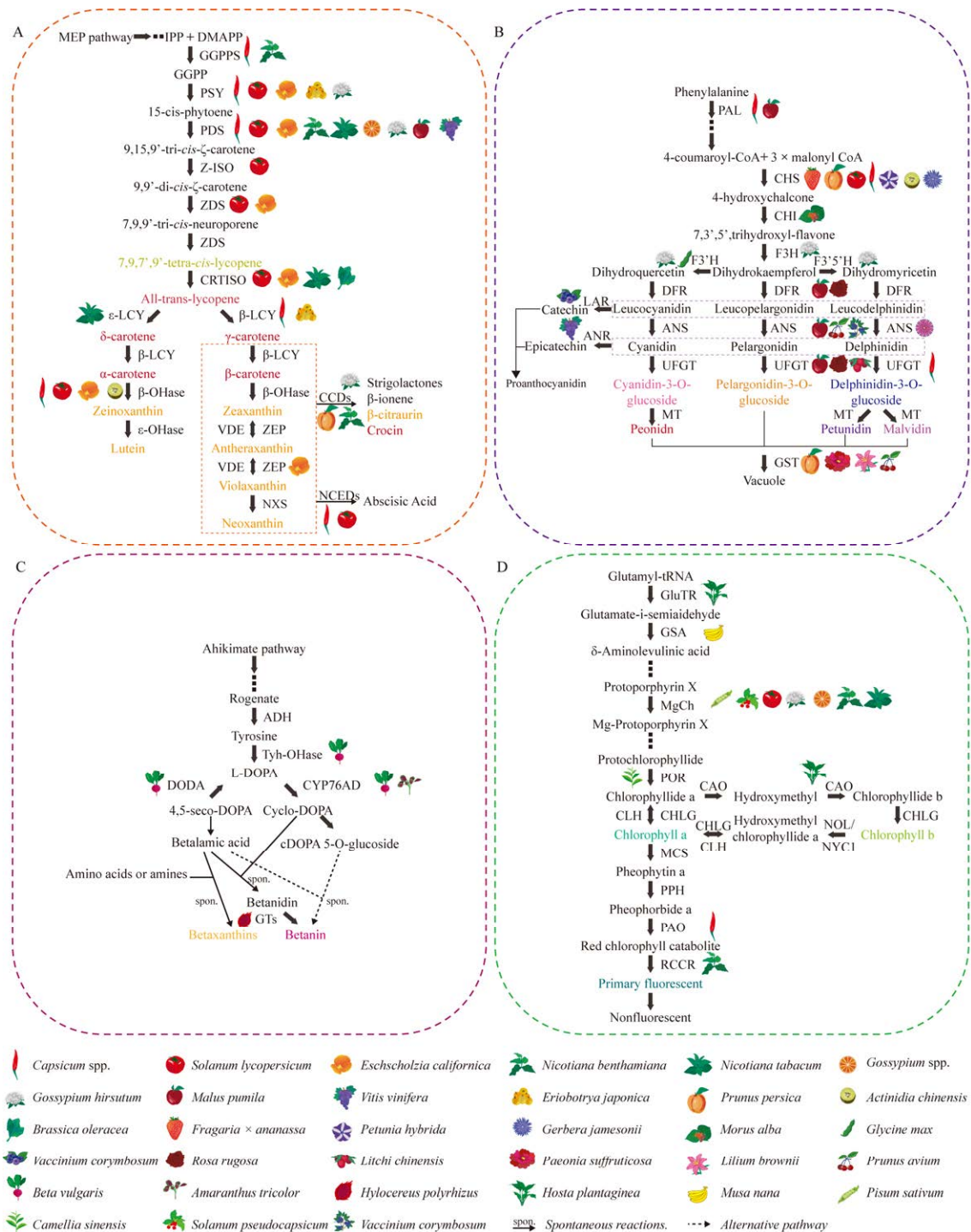


图2 利用 VIGS 技术沉默植物色素代谢途径中的结构基因 VIGS 技术在类胡萝卜素代谢途径(A)、花青素代谢途径(B)、甜菜素代谢途径(C)和叶绿素代谢途径(D)中的应用

Figure 2 Utilization of VIGS technology in silencing structural genes in phytochrome metabolic pathways. Application of VIGS technology in carotenoid metabolic pathway (A), anthocyanins metabolic pathway (B), betalains metabolic pathway (C), and chlorophyll metabolic pathway (D).

或氨基自发缩合产生黄色的甜菜黄素。在一些植物中甜菜红素合成的核心途径发生变化,葡萄糖基转移酶将葡萄糖基转移到环多巴的骨架上形成环多巴-5-葡萄糖苷,与甜菜醛氨酸缩合直接形成甜菜苷或苋菜苷^[65]。敲低红皮红肉型火龙果 [*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C.Weber) Britton & Rose] 中 *HmB5GT1* 和 *HmHCGT2* 这 2 个基因的表达,会导致火龙果的红色鳞片表现出绿色和黄色斑块,甜菜红素和甜菜黄素的积累显著减少^[66]。

4.2 甜菜素代谢调控

能够调节甜菜素的生物合成转录因子仅在一些石竹目的物种中被少量报道,如 MYB、WRKY 和 bHLH 家族的转录因子(图 3C)。R2R3-MYB 家族的转录因子 BvMYB1,可以结合 *BvDODA* 和 *BvCYP76AD1* 的启动子,直接调节 *BvDODA1* 和 *BvCYP76AD1* 的表达,沉默甜菜中 *BvMYB1* 的表达导致叶片沉默区域 *BvDODA1* 和 *BvCYP76AD1* 的转录水平均下调 99% 以上,甜菜素类色素沉着受到抑制,深红色的叶子上显示出绿色斑块^[67]。火龙果中的 HmoWRKY40 和 HmoMYB39 这 2 个转录因子均可以结合 *HmoCYP76AD1* 启动子区域中的 W-box 元件,激活 *HmoCYP76AD1* 的转录。*HmoWRKY40* 和 *HmoMYB39* 的沉默都将导致其本身和 *HmoCYP76AD1* 转录水平的共同下调,阻碍火龙果鳞片着色,且显著抑制鳞片中甜菜红素积累,但甜菜黄素的含量并未表现出明显变化^[68]。火龙果中的 HubHLH159 转录因子可以与 *HuDODA1* 中的 G-Box 顺式作用元件结合,激活 *HuDODA1* 的转录,当 *HubHLH159* 被沉默时, *HuCYP76AD1-1* 和 *HuDODA1* 的转录被抑制,火龙果鳞片无法正常变红而呈现绿色^[69]。

5 VIGS 在叶绿素代谢调控中的研究

叶绿素广泛分布于绿色植物、藻类、光合细菌和一些动物中,可以捕获和转换光能,对光合生物的光合作用至关重要^[70]。VIGS 技术在植物的叶绿素代谢中的应用对进一步探究植物的色彩变化机制起到了促进作用(图 2D)。

5.1 叶绿素前体物质合成

Glu-tRNA 还原酶 (Glu-tRNA reductase, GluTR, 由 *HEMA* 编码)催化叶绿素合成的初始酶促步骤, L-谷氨酰-tRNA 经 GluTR 还原和 L-谷氨酸酯-1-半醛 2,1 氨基变位酶(L-glutamate-1-semialdehyde 2,1 aminomutase, GSA-AM, 由 *GSA* 编码)的异构化 2 步作用,转化为叶绿素合成的重要前体物质 δ -氨基酮戊酸(δ -aminolevulinic acid, ALA)^[71](图 2D)。*HEMA* 基因是编码 GluTR 限速 ALA 合成的初始酶基因,在玉簪 [*Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers.] 中沉默 *HEMA* 的表达,导致玉簪叶片出现黄色斑点,叶肉细胞通透性发生改变^[72]。沉默香蕉 (*Musa nana* Lour.) 中的 *MaGSA* 基因,使 *MaGSA* 表达下降约 90%,导致香蕉新叶片中出现明显的褪绿表型^[73]。然后, 8 个 ALA 分子在 6 种酶的作用下进行脱氨、脱羧和氧化等生化反应合成叶绿素的代谢前体原卟啉 IX (protoporphyrin IX, ProtoIX)^[74]。

5.2 叶绿素合成

Mg-螯合酶(Mg-chelase, MgCh, 由 *CHLI*、*CHLD* 或 *CHLH* 编码)介导叶绿素合成途径中的第一个关键限速步骤,即催化 Mg^{2+} 插入 Proto IX 环转化成镁原卟啉 IX,从而将底物导入叶绿素合成的分支中^[74](图 3D)。将 *PsCHLI* 的 mRNA 水平在豌豆 (*Pisum sativum* L.) 中下调约 90%,沉默株系中 MgCh 活性降低,类囊体膜结构发育受到抑制,光合作用能力下降,新叶因叶绿素含量降低出现明显的黄白色表型^[75];

珊瑚樱(*Solanum pseudocapsicum* L.)中 *CHLH* 的沉默导致植物叶片生黄绿斑块^[76]。镁原卟啉IX通过一系列的酶促步骤形成二乙基原叶绿素,作为底物和光敏剂一同被原叶绿素酸酯氧化还原酶(protochlorophyllide oxidoreductase, POR, 由 *POR* 编码)还原成叶绿素酸酯 a。干扰这一步骤会导致叶绿素的光降解,影响植物绿色色素沉着^[77]。沉默茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.]中编码 POR 酶的 *CsPOR1* 基因,在 12–25 d 后茶树新发叶片出现典型的“光漂白”症状^[78]。最后叶绿素酸酯 a 在叶绿素合酶(chlorophyll synthase, CHLG, 由 *CHLG* 编码)的催化作用下直接形成叶绿素 a (chlorophyll a, Chl a),或在 CHLG 和叶绿素酸酯 a 加氧酶(CAO, 由 *CAO* 编码)的连续催化作用下形成叶绿素 b (chlorophyll b, Chl b)^[74]。诱导玉簪中 *HrCAO* 基因的沉默,导致叶片出现大量白色斑点,超微结构观察发现叶片白化部分类囊体由扁平变为肿胀状,内膜系统不完整^[72]。

5.3 叶绿素降解

叶绿素降解是叶片衰老和果实成熟的标志,通过 PAO/藻胆色素途径介导(图 2D)。由于脱镁叶绿素 a 氧化酶(pheide a oxygenase, Pao, 由 *PAO* 编码)对底物的催化存在特异性,Chl b 向 Chl a 的转化是叶绿素降解的先决条件。Chl b 需通过 NYC1 和 NOL 形成 Chl b 还原酶复合物联合羟甲基叶绿素 a 还原酶(7-Hydroxymethyl chlorophyll a reductase, HCAR, 由 *NYE* 或 *SGR* 编码)启动 2 个连续的还原步骤,先还原为 7-羟甲基叶绿素 a 中间体,再还原为 Chl a。Chl a 通过相应的酶促和非酶促反应催化脱植基和脱 Mg^{2+} 形成脱镁叶绿素 a,随后被 PAO 催化打开卟啉环形成氧化的红色叶绿素分解代谢物(red chlorophyll catabolite, RCC)^[79]。辣椒中 *CaPAO* 既参与叶绿素降解途径也参与对盐胁迫的响应,沉默辣椒中的 *CaPAO* 后,分别对沉默株系与对

照株系取样,置于高盐条件下处理,结果表明 *CaPAO* 沉默系辣椒叶绿素降解速率与对照株系相比,明显延缓^[80]。最后 RCC 还原酶(RCC reductase, RCCR, 由 *RCCR* 编码)特异性地还原 RCC 的 C15/C16 双键形成最终的叶绿素代谢物,通过抑制本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* L.)中 *NbRCCR* 的表达,导致 Chl a 和类胡萝卜素含量增加^[81]。

5.4 叶绿素代谢调控

光、乙烯和辅酶信号之间错综复杂地串联在一起,共同调节着叶绿素的生物合成,然而对叶绿素生物合成通路上结构基因起到直接调控作用的转录因子报道较少,因此 VIGS 技术在叶绿素代谢调控上的应用同样十分有限(图 3D)。光信号调节是影响叶绿素合成的主要调节机制,光响应因子 CsDOF3 和 CsMYB308 形成调节叶绿素的拮抗复合物,分别对茶叶中的 *CsCLHI* 基因进行正向和负向调控,在遮荫条件下, CsDOF3 抑制 *CsCLHI* 启动子活性,促进叶绿素的积累,而在光照条件下 CsMYB308 通过与 *CsCLHI* 启动子中的 MYB 顺式作用元件结合,正调节叶绿素含量。CsDOF3 在茶叶中沉默使叶片颜色略呈浅绿色, *CsCLHI* 的转录水平变高,叶绿素含量变低, CsMYB308 的沉默表型则与之相反^[82]。

植物激素在叶绿素降解途径的调控上也发挥着重要的作用。葡萄中的乙烯响应因子 VvEFR17 可以作为转录激活剂结合 VvNOL、VvPPH、VvPAO 和 VvRCCR 的启动子,激活它们的转录。VvERF17 在葡萄叶中的沉默使部分叶绿素降解相关基因的表达受到抑制,但葡萄叶的颜色和叶绿素含量并未改变,推测与基因的冗余有关^[83];番茄中,能够正调控 *PSY1* 的乙烯响应因子 RIN 也可以直接靶向 *SGR1* 参与调控叶绿素降解, *LeRIN* 的沉默导致叶绿素分解和类胡萝卜素合成受抑制,使番茄果实呈绿色^[30]。

此外还存在一些与植物发育相关的转录因

子参与调控叶绿素的代谢, 如 *NOR* 可以靶向 *SISGR1* 和 *SIPPH* 的启动子区域, 调节叶绿素的降解, 沉默番茄果实中 *NOR* 的表达, 会使在沉默区域显示出明显的绿色, 同时在未被沉默的区域显示出黄色^[84-85]; Homeobox 家族的 *SIBEL11* 能结合 *SIPOR* 的启动子, 负调控未成熟的番茄果实中的叶绿素合成和叶绿体发育, *SIBEL11* 的

沉默促进了番茄果实中叶绿素的积累, 使番茄果实产生绿色和浅红色的斑驳表型^[86]。

总之, VIGS 技术在植物色素代谢机制的研究中已得到较为广泛的应用(表 1), 同时, 在进一步探究植物色素代谢关键结构基因的功能与挖掘相关调控转录因子等方面 VIGS 技术仍有较大的应用潜力。

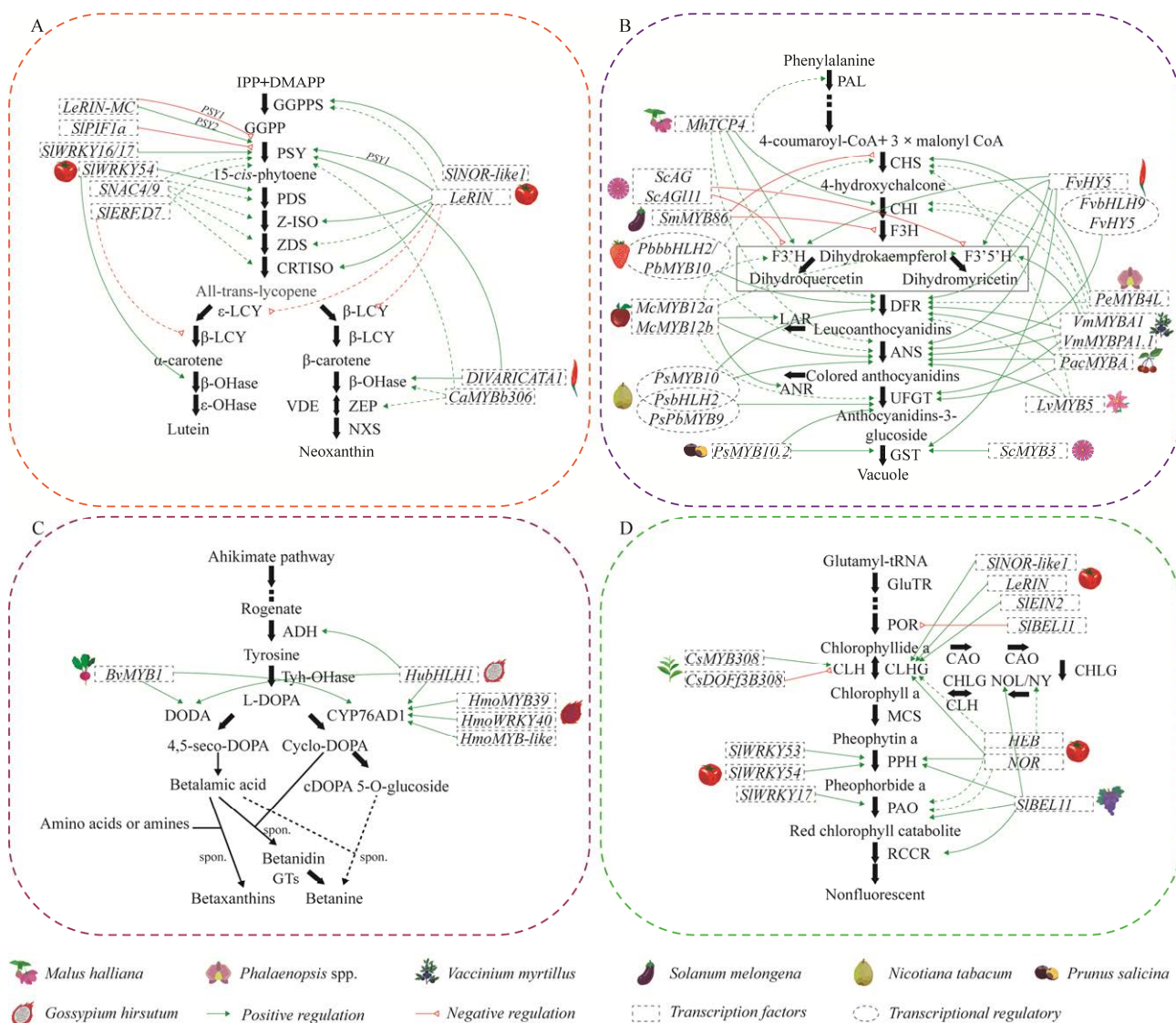


图3 利用 VIGS 技术沉默植物色素代谢途径中的转录因子 VIGS 技术在类胡萝卜素代谢调控(A)、花青素代谢途径(B)、甜菜素代谢途径(C)和叶绿素代谢途径(D)中的应用

Figure 3 Utilization of VIGS technology in silencing transcription factors in phytochrome metabolic pathways. Application of VIGS technology in the regulation of carotenoid metabolism (A), anthocyanins metabolism (B), betalains metabolism (C), and chlorophyll metabolism (D). Other plant illustrations are shown in Figure 1.

表 1 利用 VIGS 技术沉默植物色素代谢相关基因总结

Table 1 VIGS system utilized to silence the expression of genes related to phytochrome metabolism

Pigments	Plants	Vectors	Gene	Plant tissue	Reference
Carotenoids	<i>Gossypium hirsutum</i>	TRV	<i>GhPSY</i> ; <i>GhCCD1D</i> and <i>GhCCD4-2A</i>	Leaf	[14,28]
	<i>Solanum lycopersicum</i>	TRV	<i>SIPSY1/2/3</i> ; <i>SIPDS</i> ; <i>SIZDS</i> ; <i>SIZISO</i> ; <i>SICRTISO</i> ; <i>SINCED1</i> ; <i>SIWRKY16/17/54</i> ; <i>SINOR-like1</i> ; <i>LeRIN</i> and <i>PIFa</i>	Fruit	[15,29-31, 33-34]
	<i>Oryza sativa</i>	RTBV	<i>OsPDS</i>	Leaf	[17]
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	TRV	<i>NbPDS</i> and <i>Ntε-LCY1</i>	Leaf	[21]
	<i>Antirrhinum majus</i>	TRV	<i>AmPDS</i>	Leaf and flower	[87]
	<i>Eschscholzia californica</i>	TRV	<i>EcPSY</i> ; <i>EcPDS</i> ; <i>EcZDS</i> ; <i>Ecβ-OH</i> and <i>EcZEP</i>	Leaf and flower	[19]
	<i>Nicotiana tabacum</i>	TRV	<i>NtCRTISO</i>	Leaf	[88]
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>albiflora</i>	TYMV	<i>BoaCRTISO</i>	Leaf	[20]
	<i>Eriobotrya japonica</i>	TRV	<i>EjCYC-B</i> and <i>EjPSY</i>	Fruit	[22]
	<i>Actinidia chinensis</i>	TRV	<i>AcBCH1</i>	Fruit	[24]
	<i>Capsicum</i> spp.	TRV	<i>CaNCED1/3</i> and <i>DIVARICATA1</i>	Fruit	[26,32]
	<i>Prunus persica</i>	TRV	<i>PpCCD4</i>	Fruit	[28]
	<i>Citrus reticulata</i>	CTV	<i>CrPDS</i>	Leaf	[89]
	<i>Vitis vinifera</i>	GVA	<i>VvPDS</i>	Leaf	[90]
	<i>Zea mays</i>	MRFV	<i>ZmPDS</i>	Leaf	[91]
	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>nudum</i>	BSMV	<i>PDS</i>	Leaf	[92]
	<i>Hordeum vulgare</i>	FoMV	<i>HvPDS</i>	Leaf	[93]
	<i>Setaria italica</i>	FoMV	<i>SiPDS</i>	Leaf	[93]
	<i>Triticum aestivum</i>	FoMV	<i>TaPDS</i>	Leaf	[93]
Anthocyanins	<i>Capsicum</i> spp.	TRV	<i>CaPAL</i> ; <i>CaHY5</i> and <i>WD40</i>	Fruit and leaf	[37,59,94]
	<i>Actinidia eriantha</i>	TRV	<i>AeCHS</i>	Flower	[39]
	<i>Gerbera jamesonii</i>	TRV	<i>GCHS1/4</i>	Flower	[40]
	<i>Morus alba</i>		<i>MmCHI1/2</i>	Leaf	[41]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	TRV	<i>GhF3H</i> ; <i>GhF3'H</i> and <i>GhF3'5'H</i>	Fiber	[42]
	<i>Glycine max</i>	CMV	<i>sF3'H1</i>	Seed pods	[43]
	<i>Rosa rugosa</i>	TRV	<i>RhDFR1</i> and <i>RrGT1/2</i>	Flower	[44,49-50]
	<i>Vaccinium corymbosum</i>	TRV	<i>VcANS</i>	Fruit	[45]
	<i>Pericallis hybrida</i>	TRV	<i>ScANS</i>	Leaf and flower	[46]
	<i>Litchi chinensis</i>	TRV	<i>LcUFGT1</i>	Pericarp	[48]
	<i>Prunus persica</i>	TRV	<i>PpGST</i>	Fruit	[95]
	<i>Vitis vinifera</i>	TRV	<i>VvANR</i> and <i>VvMYBA1</i>	Fruit	[51]
	<i>Phalaenopsis</i> spp.	CymMV	<i>PeMYB4L</i>	Flower	[52]
	<i>Vaccinium myrtillus</i>	TRV	<i>VmMYBA1</i> and <i>VmMYBPA1.1</i>	Fruit	[53]
	<i>Lilium brownii</i>	TRV	<i>LvMYB5</i>	Flower	[55]
	<i>Pericallis hybrida</i>	TRV	<i>ScMYB3</i> ; <i>ScAG</i> and <i>ScAG111</i>	Leaf	[56,96]
	<i>Fragaria × ananassa</i>	TRV	<i>FvbHLH9</i> and <i>FvHY5</i>	Fruit	[58]

(待续)

(续表 1)

Pigments	Plants	Vectors	Gene	Plant tissue	Reference
Betalain	<i>Amaranthus tricolor</i>	TRV	<i>AtriCYP76AD1</i>	Leaf and stem	[62]
	<i>Beta vulgaris</i>	TRV	<i>BvCYP76AD6; BvCYP76AD1, BvDODA1/2 and BvMYB1</i>	Leaf and hypocotyl	[63-64,67]
	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	TRV	<i>Hmb5GT1; HmHCGT2; HmoWRKY7/31/40 and HubHLH159 HmoMYB39 and HmoMYB- like</i>	Scale	[66,68-69]
Chlorophylls	<i>Oryza sativa</i>	RTBV	<i>OsCHLH</i>	Leaf	[17]
	<i>Hordeum vulgare</i>	FoMV	<i>HvCHLH</i>	Leaf	[93]
	<i>Hosta plantaginea</i>		<i>HrHEMA; HrPDR and HrCAO</i>	Leaf	[72]
	<i>Musa nana</i>	CMV	<i>MaGSA</i>	Leaf	[73]
	<i>Pisum sativum</i>	PEBV	<i>PsCHLI</i>	Leaf	[76]
	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	TRV	<i>SpCHLH</i>	Leaf	[77]
	<i>Camellia sinensis</i>	TRV	<i>CsPOR1; CsDOF3 and CsMYB308</i>	Leaf	[78,82]
	<i>Capsicum annuum</i>	TRV	<i>CaPAO</i>	Leaf	[80]
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	TRV	<i>NbRCCR</i>	Leaf	[81]
	<i>Solanum lycopersicum</i>	TRV	<i>SIBEL11; RIN and NOR</i>	Fruit	[30,85-86]
	<i>Citrus reticulata</i>	CTV	<i>CrALAD</i>	Leaf	[89]

TRV: Tobacco rattle virus; RTBV: Rice tungro bacilliform virus; TYMV: Turnip yellow mosaic virus; CTV: Citrus tristeza virus; GVA: Grapevine virus A; MRFV: Maize rayado fino virus; BSMV: Barley stripe mosaic virus; FoMV: Foxtail mosaic virus; CMV: Cucumber mosaic virus; CymMV: Cymbidium mosaic virus; PEBV: Pea early-browning virus; TuYV: Turnip yellows virus.

6 VIGS 衍生技术及其在色素代谢研究上的潜力

6.1 MIR-VIGS

miRNA 作为转录后水平上基因表达的负调节因子,是一类 20–24 nt 的内源性非编码小 RNA (non-coding small RNA, ncRNAs)^[97]。病毒介导的 miRNA 过度表达,诱导内源性基因转录沉默的系统被称为 miRNA 介导的病毒诱导基因沉默 (MIR-VIGS) 系统,是一项研究靶基因功能的有效技术。基于甘蓝曲叶病毒 (CaLCuV) 开发的一种可以递送人工 RNA (artificial micro-RNA, amiRNA) 的 MIR-VIGS 系统,成功诱导了烟草中 *NtPDS* 基因的靶向沉默,使烟草叶片产生白化表型^[98]。

6.2 VbMS

短串联靶标模拟 (short tandem target mimic,

STTM) 被证实是调控 miRNA 的有效技术。其原理是在 STTM 构建体预期的 miRNA 结合序列中,人工插入一段核苷酸序列,形成具有不可切割的 miRNA 结合位点,捕获 miRNA 产生竞争性结合,使 miRNA 的功能活性被阻断而不能有效抑制靶 RNA 的表达^[99]。基于病毒的 miRNA 抑制 (virus-based microRNA silencing, VbMS) 系统可以将目的 miRNA 的模拟靶标重组到病毒基因组 RNA 中感染植物,植物则会因该 miRNA 功能丧失而产生相应的表型^[100]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 通过将人工构建的模拟靶标被插入到 TRV RNA2 的基因组中,成功下调拟南芥中的 miR156 和 miR159,而 miR156 在许多植物中靶向 *SPL* 基因调节植物中花青素的积累,miR159 则对植物的叶绿素代谢和叶绿体发育有重要的调节

作用^[101]。

6.3 VIGE

病毒诱导的基因编辑(virus-induced genome editing, VIGE)是一种通过病毒载体和 CRISPR-CAS 系统相结合靶向基因组进行定点修饰的高效基因组工程工具。当携带表达目标特异性向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)的 VIGE 载体通过农杆菌渗透感染稳定表达 Cas9 的转基因株系,可产生经过基因编辑的 Cas9 转基因种子,再通过多次自交或与野生型回交后代获得无外源 DNA 基因的种子^[102-103]。也可以将整个 CRISPR/Cas9 表达盒插入病毒基因组中在植物内同时传递 Cas9 和 sgRNA 以定向敲除靶基因,最后通过组织培养再生获得突变的植株^[104]。据报道,基于马铃薯 X 病毒(potato X virus, PVX)的基因组编辑载体 PVX-Cas9 成功实现了对本氏烟草中 *NbPDS* 基因的靶向诱变^[105]。

7 展望

VIGS 技术是鉴定植物基因功能的有效反向遗传学技术,潜力巨大。对于已经成功构建稳定转基因体系的植物, VIGS 技术可以结合代谢组学、转录组学等组学的分析结果,在前期大批量快速筛选与性状相关的候选基因或细化基因同系物的功能。对于难以构建稳定遗传转化体系的非模式植物, VIGS 技术提供了一个可靠的高通量平台,绕过常规的组织培养步骤,以经济高效的方式快速表征基因功能。本课题组在前期以彩叶桂花品种‘银碧双辉’为材料,结合转录组测序,鉴定出 *OjHSA2*、*OjTCP20* 和 *OjWRKY4* 等参与调节叶绿素和类胡萝卜素代谢的枢纽基因,但因桂花缺乏稳定的本源遗传转化体系,目前,这些基因的功能鉴定主要通过烟草等模式植物中的异源转化实现。因此,近期本课题组以‘日香桂’为实验材料,探索并构建了桂花中的 VIGS

体系,以期在今后通过 VIGS 实验进一步验证前期所筛选出的 *OjHSA2* 和 *OjTCP20* 等基因在彩叶桂叶片成色过程中发挥的作用,从而揭示彩叶桂叶片的颜色形成机制。

同时, VIGS 技术也存在一些限制:第一,针对 VIGS 技术本身而言,它是一种在 RNA 水平上对目的基因进行沉默而非完全敲除目的基因在整个基因组中表达的技术,降低转录水平仍可能产生足够的功能蛋白,从而导致植物基因沉默表型不明显。第二,通过 VIGS 技术在植物中诱导的沉默表型往往难以遗传,即使能够遗传也会存在效率不高或遗传表型不稳定等问题。这些问题有望通过与 CRISPR-CAS 系统结合的 VIGE 技术解决。

尽管 VIGS 技术在研究植物色素的代谢调控机制上取得了一定的进展,但在未来的工作中仍有一些问题值得探索。在植物色素代谢的转录调控层面,一些转录因子或转录调控复合物参与了多种色素的代谢调控,表现出相同或相反的调控机制。番茄中的 SIMYB72 转录因子蛋白能够正调控 *SIPSY*、*SIZISO*, 促进类胡萝卜素的生物合成;负调控 *SI4CL*、*SICH51/2*、*SIPOR* 和 *SICHLH*, 抑制花青素和叶绿素的生物合成^[106]。MtWP1 能够直接激活蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 中胡萝卜素或花青素生物合成相关基因 *MtLCYE*、*MtLCYB*、*MtCHS* 和 *MtANS* 的启动子活性,促进蒺藜苜蓿花瓣中类胡萝卜素和花青素的积累^[107]。对这一类转录因子功能的鉴定是将不同色素的代谢调控网络联系起来的关键。通过结合 VIGS 文库技术,筛选出在多个植物色素代谢通路上起到调控作用的转录因子,进一步探究植物色素代谢调控的内在联系,或可以作为 VIGS 技术未来应用的新方向。

表观遗传修饰是植物色素调控的另一重要部分,包括非编码 RNA 调控、组蛋白修饰和

DNA 甲基化等。如 miR167 和 miR1857 被预测靶向柳橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 中的 *GGPS* 和 *LYCb* 基因调节类胡萝卜素的合成^[108]；葡萄中的 E3 泛素连接酶 VviKFB07 能够介导 VviCHSs 蛋白的泛素化，降低葡萄愈伤中的花青素积累^[109]。诱导靶向色素代谢相关基因的 miRNA、泛素连接酶或乙酰化酶等的功能活性丧失，可以从表观遗传层面揭示植物色素代谢机制，为快速推进功能基因组学研究、破译植物中的色素比例调节机制和解剖广泛的植物色彩变化过程提供新的角度。

REFERENCES

- [1] STANLEY L, YUAN YW. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1017.
- [2] SENTHIL-KUMAR M, LEE HK, MYSORE KS. VIGS-mediated forward genetics screening for identification of genes involved in nonhost resistance[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2013(78): e51033.
- [3] TOSSI VE, MARTÍNEZ TOSAR L, PITTA-ÁLVAREZ SI, CAUSIN HF. Casting light on the pathway to betalain biosynthesis: a review[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2021, 186: 104464.
- [4] RÖSSNER C, LOTZ D, BECKER A. VIGS goes viral: how VIGS transforms our understanding of plant science[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2022, 73: 703-728.
- [5] SILVA-MARTINS G, BOLAJI A, MOFFETT P. What does it take to be antiviral? An Argonaute-centered perspective on plant antiviral defense[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(20): 6197-6210.
- [6] CODY WB, SCHOLTHOF HB. Plant virus vectors 3.0: transitioning into synthetic genomics[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2019, 57: 211-230.
- [7] KOBAYASHI H, TOMARI Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2016, 1859(1): 71-81.
- [8] NAGANO H, FUKUDOME A, HIRAGURI A, MORIYAMA H, FUKUHARA T. Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(3): 1845-1856.
- [9] YE RQ, WANG W, IKI T, LIU C, WU Y, ISHIKAWA M, ZHOU XP, QI YJ. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA complexes[J]. *Molecular Cell*, 2012, 46(6): 859-870.
- [10] NISAR N, LI L, LU S, KHIN NC, POGSON BJ. Carotenoid metabolism in plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 68-82.
- [11] PAUDEL L, KERR S, PRENTIS P, TANURDZIC M, PAPANICOLAOU A, PLETT JM, CAZZONELLI CI. Horticultural innovation by viral-induced gene regulation of carotenogenesis[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: DOI: <https://doi.org/10.1093/hr/uhab008>.
- [12] WANG Q, HUANG XQ, CAO TJ, ZHUANG Z, WANG R, LU S. Heteromeric geranylgeranyl diphosphate synthase contributes to carotenoid biosynthesis in ripening fruits of red pepper (*Capsicum annuum* var. *conoides*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(44): 11691-11700.
- [13] ZHOU XS, RAO S, WRIGHTSTONE E, SUN TH, LUI ACW, WELSCH R, LI L. Phytoene synthase: the key rate-limiting enzyme of carotenoid biosynthesis in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 884720.
- [14] KHAN AH, AKRAM A, SAEED M, RAHMAN M, REHMAN A, MANSOOR S, AMIN I. Establishment of transcriptional gene silencing targeting the promoter regions of *GFP*, *PDS*, and *PSY* genes in cotton using virus-induced gene silencing[J]. *Molecular Biotechnology*, 2022: 1-10.
- [15] FANTINI E, FALCONE G, FRUSCIANTE S, GILIBERTO L, GIULIANO G. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 986-998.
- [16] SUN TH, LI L. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants[J]. *Plant Science*, 2020, 290: 110331.
- [17] KANT R, DASGUPTA I. Phenotyping of VIGS-mediated gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(7): 1159-1170.
- [18] EFREMOV GI, DZHOS E, ASHIKHMIN A, KOCHIEVA E, SHCHENNIKOVA A. Effect of the carotenoid content and activity of the carotene *cis-trans* isomerase CRTISO on tomato fruit color[J].

- Russian Journal of Plant Physiology, 2022, 69(4): 64.
- [19] ZHOU J, HUNTER DA, LEWIS DH, MCMANUS MT, ZHANG HB. Insights into carotenoid accumulation using VIGS to block different steps of carotenoid biosynthesis in petals of California poppy[J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(9): 1311-1323.
- [20] JIANG M, ZHANG F, YUAN Q, LIN PX, ZHENG H, LIANG S, JIAN Y, MIAO HY, LI HX, WANG QM, SUN B. Characterization of BoacRTISO reveals its role in carotenoid biosynthesis in Chinese kale[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 662684.
- [21] SHI YM, WANG R, LUO ZP, JIN LF, LIU PP, CHEN QS, LI ZF, LI F, WEI CY, WU MZ, WEI P, XIE H, QU LB, LIN FC, YANG J. Molecular cloning and functional characterization of the lycopene ϵ -cyclase gene *via* virus-induced gene silencing and its expression pattern in *Nicotiana tabacum*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 14766-14785.
- [22] HONG M, CHI ZH, WANG YQ, TANG YM, DENG QX, HE MY, WANG RK, HE YZ. Expression of a chromoplast-specific lycopene β -cyclase gene (*CYC-B*) is implicated in carotenoid accumulation and coloration in the loquat[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 874.
- [23] TIAN SL, LI L, CHAI WG, SHAH SNM, GONG ZH. Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 1-12.
- [24] XIA H, ZHOU YJ, LIN ZY, GUO YQ, LIU XL, WANG T, WANG J, DENG HH, LIN LJ, DENG QX, LV XL, XU KF, LIANG D. Characterization and functional validation of β -carotene hydroxylase *AcBCH* genes in *Actinidia chinensis*[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac063.
- [25] SATHASIVAM R, RADHAKRISHNAN R, KIM JK, PARK SU. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants[J]. South African Journal of Botany, 2021, 140: 290-302.
- [26] HOU BZ, LI CL, HAN YY, SHEN YY. Characterization of the hot pepper (*Capsicum frutescens*) fruit ripening regulated by ethylene and ABA[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 1-12.
- [27] JI K, KAI WB, ZHAO B, SUN YF, YUAN B, DAI SJ, LI Q, CHEN P, WANG Y, PEI YL, WANG HQ, GUO YD, LENG P. *SINCE1* and *SICYP707A2*: key genes involved in ABA metabolism during tomato fruit ripening[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(18): 5243-5255.
- [28] BAI SL, TUAN PA, TATSUKI M, YAEAGAKI H, OHMIYA A, YAMAMIZO C, MORIGUCHI T. Knockdown of carotenoid cleavage dioxygenase 4 (*CCD4*) *via* virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit: evaluation of gene function related to fruit traits[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(1): 257-264.
- [29] WANG L, ZHANG XL, WANG L, TIAN YN, JIA N, CHEN SZ, SHI NB, HUANG XM, ZHOU C, YU YW, ZHANG ZQ, PANG XQ. Regulation of ethylene-responsive *SlWRKYs* involved in color change during tomato fruit ripening[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16674.
- [30] LI L, WANG XG, ZHANG XH, GUO M, LIU TL. Unraveling the target genes of RIN transcription factor during tomato fruit ripening and softening[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(3): 991-1000.
- [31] LI S, XU H, JU Z, CAO D, ZHU H, FU D, GRIERSON D, QIN G, LUO Y, ZHU B. The RIN-MC fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 891-909.
- [32] SONG J, SUN B, CHEN C, NING Z, ZHANG S, CAI Y, ZHENG X, CAO B, CHEN G, JIN D, LI B, BIAN J, LEI J, HE H, ZHU Z. An R-R-type MYB transcription factor promotes non-climacteric pepper fruit carotenoid pigment biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2023.
- [33] LLORENTE B, D'ANDREA L, RUIZ-SOLA MA, BOTTERWEG E, PULIDO P, ANDILLA J, LOZA-ALVAREZ P, RODRIGUEZ-CONCEPCION M. Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism[J]. The Plant Journal, 2016, 85(1): 107-119.
- [34] GAO Y, WEI W, ZHAO XD, TAN XL, FAN ZQ, ZHANG YP, JING Y, MENG LH, ZHU BZ, ZHU HL, CHEN JY, JIANG CZ, GRIERSON D, LUO YB, FU DQ. A NAC transcription factor, NOR-like1, is a new positive regulator of tomato fruit ripening[J]. Horticulture Research, 2018, 5: 75.
- [35] ZHANG Y, BUTELLI E, MARTIN C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 19: 81-90.
- [36] LIU W, FENG Y, YU S, FAN Z, LI X, LI J, YIN H.

- The flavonoid biosynthesis network in plants[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(23): 12824.
- [37] CHENG GX, -T SUN J, SHANG J, GONG Z. Virus-induced gene silencing for phenylalanine ammonia-lyase affects pepper adaption to low temperature[J]. Biologia Plantarum, 2019, 63(1): 601-609.
- [38] LO PIERO AR. The state of the art in biosynthesis of anthocyanins and its regulation in pigmented sweet oranges (*Citrus sinensis*) L. osbeck[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(16): 4031-4041.
- [39] LI YK, CUI W, QI XJ, QIAO CK, LIN MM, ZHONG YP, HU CG, FANG JB. Chalcone synthase-encoding *AcCHS* is involved in normal petal coloration in *Actinidia eriantha*[J]. Genes, 2019, 10(12): 949.
- [40] DENG XB, BASHANDY H, AINASOJA M, KONTTURI J, PIETIÄINEN M, LAITINEN RAE, ALBERT VA, VALKONEN JPT, ELOMAA P, TEERI TH. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*[J]. The New Phytologist, 2014, 201(4): 1469-1483.
- [41] CHAO N, WANG RF, HOU C, YU T, MIAO K, CAO FY, FANG RJ, LIU L. Functional characterization of two chalcone isomerase (*CHI*) revealing their responsibility for anthocyanins accumulation in mulberry[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 161: 65-73.
- [42] ZHENG H, DUAN B, YUAN B, CHEN Z, YU D, KE L, ZHOU W, LIU H, SUN Y. Flavanone and flavonoid hydroxylase genes regulate fiber color formation in naturally colored cotton[J]. The Crop Journal, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.10.004>.
- [43] NAGAMATSU A, MASUTA C, MATSUURA H, KITAMURA K, ABE J, KANAZAWA A. Down-regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(1): 32-39.
- [44] YAN HJ, SHI SC, MA N, CAO XQ, ZHANG H, QIU XQ, WANG QG, JIAN HY, ZHOU NN, ZHANG Z, TANG KX. Graft-accelerated virus-induced gene silencing facilitates functional genomics in rose flowers[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(1): 34-44.
- [45] TIAN LL, LIU LQ, JIANG YQ, YANG YR, DONG GQ, YU H. Tobacco rattle virus-induced *VcANS* gene silencing in blueberry fruit[J]. Gene, 2023, 852: 147054.
- [46] LI YJ, LIU YT, QI FT, DENG CY, LU CF, HUANG H, DAI S. Establishment of virus-induced gene silencing system and functional analysis of *ScbHLH17* in *Senecio cruentus*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 147: 272-279.
- [47] SUNIL L, SHETTY NANDINI P. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(5-6): 1783-1798.
- [48] LI XJ, ZHANG JQ, WU ZC, LAI B, HUANG XM, QIN YH, WANG HC, HU GB. Functional characterization of a glucosyltransferase gene, *LcUGFT1*, involved in the formation of cyanidin glucoside in the pericarp of *Litchi chinensis*[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 156(2): 139-149.
- [49] SUI XM, ZHAO MY, HAN X, ZHAO LY, XU ZD. *RrGTL1*, a key gene associated with anthocyanin biosynthesis, was isolated from *Rosa rugosa* and identified *via* overexpression and VIGS[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 135: 19-29.
- [50] SUI XM, ZHAO MY, XU ZD, ZHAO LY, HAN X. *RrGTL2*, a key gene associated with anthocyanin biosynthesis in *Rosa rugosa*, was identified *via* virus-induced gene silencing and overexpression[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4057.
- [51] YANG B, WEI Y, LIANG CM, GUO JY, NIU TQ, ZHANG PF, WEN PF. VvANR silencing promotes expression of VvANS and accumulation of anthocyanin in grape berries[J]. Protoplasma, 2022, 259(3): 743-753.
- [52] WANG R, MAO C, MING F. PeMYB4L interacts with PeMYC4 to regulate anthocyanin biosynthesis in *Phalaenopsis orchid*[J]. Plant Science, 2022, 324: 111423.
- [53] KARPPINEN K, LAFFERTY DJ, ALBERT NW, MIKKOLA N, MCGHIE T, ALLAN AC, AFZAL BM, HAGGMAN H, ESPLEY RV, JAAKOLA L. MYBA and MYBPA transcription factors co-regulate anthocyanin biosynthesis in blue-coloured berries[J]. New Phytologist, 2021, 232(3): 1350-1367.
- [54] YAN HL, PEI XN, ZHANG H, LI X, ZHANG XX, ZHAO MH, CHIANG VL, SEDEROFF RR, ZHAO XY. MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis[J].

- International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3103.
- [55] YIN XJ, ZHANG YB, ZHANG L, WANG BH, ZHAO YD, IRFAN M, CHEN LJ, FENG YL. Regulation of MYB transcription factors of anthocyanin synthesis in lily flowers[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 761668.
- [56] CUI Y, FAN J, LU C, REN J, QI F, HUANG H, DAI S. ScGST3 and multiple R2R3-MYB transcription factors function in anthocyanin accumulation in *Senecio cruentus*[J]. *Plant Science*, 2021, 313:111094.
- [57] QIU ZK, WANG HJ, LI DJ, YU BW, HUI QL, YAN SS, HUANG ZJ, CUI X, CAO BH. Identification of candidate HY5-dependent and-independent regulators of anthocyanin biosynthesis in tomato[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(3): 643-656.
- [58] LI Y, XU PB, CHEN GQ, WU J, LIU ZC, LIAN HL. FvbHLH9 functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis by forming a HY5-bHLH9 transcription complex in strawberry fruits[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2020, 61(4): 826-837.
- [59] CHEN R, YANG C, GAO H, SHI CM, ZHANG ZY, LU GY, SHEN XY, TANG YP, LI F, LU YE, OUYANG B. Induced mutation in *ELONGATED HYPOCOTYL5* abolishes anthocyanin accumulation in the hypocotyl of pepper[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(10): 3455-3468.
- [60] GANDÍA-HERRERO F, ESCRIBANO J, GARCÍA-CARMONA F. Biological activities of plant pigments betalains[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(6): 937-945.
- [61] POLTURAK G, AHARONI A. "La vie en rose": biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(1): 7-22.
- [62] ADHIKARY D, KHATRI-CHHETRI U, TYMM F, MURCH S, DEYHOLOS M. A virus-induced gene-silencing system for functional genetics in a betalainic species, *Amaranthus tricolor* (*Amaranthaceae*)[J]. *Applications in Plant Sciences*, 2019, 7(2): e01221.
- [63] POLTURAK G, BREITEL D, GROSSMAN N, SARRION-PERDIGONES A, WEITHORN E, PLINER M, ORZAEZ D, GRANELL A, ROGACHEV I, AHARONI A. Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(1): 269-283.
- [64] BEAN A, SUNNADENIYA RM, AKHAVAN N, CAMPBELL A, BROWN M, LLOYD A. Gain-of-function mutations in beet DODA2 identify key residues for betalain pigment evolution[J]. *New Phytologist*, 2018, 219(1): 287-296.
- [65] TIMONEDA A, FENG T, SHEEHAN H, WALKER-HALE N, PUCKER B, LOPEZ-NIEVES S, GUO R, BROCKINGTON S. The evolution of betalain biosynthesis in *Caryophyllales*[J]. *New Phytologist*, 2019, 224(1): 71-85.
- [66] XIE FF, HUA QZ, CHEN CB, ZHANG LL, ZHANG ZK, CHEN JY, ZHANG R, ZHAO JS, HU GB, ZHAO JT, QIN YH. Transcriptomics-based identification and characterization of glucosyltransferases involved in betalain biosynthesis in *Hylocereus megalanthus*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 152(39): 112-124.
- [67] HATLESTAD GJ, AKHAVAN NA, SUNNADENIYA RM, ELAM L, CARGILE S, HEMBD A, GONZALEZ A, MCGRATH JM, LLOYD AM. The beet Y locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(1): 92-96.
- [68] ZHANG LL, CHEN CB, XIE FF, HUA QZ, ZHANG ZK, ZHANG R, CHEN JY, ZHAO JT, HU GB, QIN YH. A novel WRKY transcription factor HmoWRKY40 associated with betalain biosynthesis in pitaya (*Hylocereus monacanthus*) through regulating HmoCYP76AD1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 2171.
- [69] CHEN JY, XIE FF, SHAH K, CHEN CB, ZENG JW, CHEN JX, ZHANG ZK, ZHAO JT, HU G, QIN YH. Identification of HubHLH family and key role of HubHLH159 in betalain biosynthesis by activating the transcription of HuADH1, HuCYP76AD1-1, and HuDODA1 in pitaya[J]. *Plant Science*, 2023: 111595.
- [70] HIROSHI Y, TAKESHI I, KENJI N, TETSUYA Y, WATARU S, MAKOTO K. Genetic analysis of chlorophyll synthesis and degradation regulated by BALANCE of CHLOROPHYLL METABOLISM[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 419-432.
- [71] STENBAEK A, JENSEN PE. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(8): 853-859.
- [72] ZHANG JY, SUI CH, LIU HM, CHEN JJ, HAN ZL, YAN Q, LIU SY, LIU HZ. Effect of chlorophyll biosynthesis-related genes on the leaf color in *Hosta* (*Hosta plantaginea* Aschers) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 45.

- [73] TZEAN Y, LEE MC, JAN HH, CHIU YS, TU TC, HOU BH, CHEN HM, CHOU CN, YEH HH. Cucumber mosaic virus-induced gene silencing in banana[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 11553.
- [74] QIU NW, JIANG DC, WANG XS, WANG BS, ZHOU F. Advances in the members and biosynthesis of chlorophyll family[J]. Photosynthetica, 2019, 57(4): 974-984.
- [75] WU CJ, WANG J, ZHU J, REN J, YANG YX, LUO T, XU LY, ZHOU QH, XIAO XF, ZHOU YX, LUO S. Molecular characterization of Mg-chelatase CHLI subunit in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 7.
- [76] XU H, XU LF, YANG PP, CAO YW, TANG YC, HE GR, YUAN SX, MING J. Tobacco rattle virus-induced *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* and *Mg-chelatase H subunit (ChlH)* gene silencing in *Solanum pseudocapsicum* L.[J]. PeerJ, 2018, 6: e4424.
- [77] WANG P, JI S, GRIMM B. Post-translational regulation of metabolic checkpoints in plant tetrapyrrole biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(14): 4624-4636.
- [78] LI GB, LI Y, YAO XZ, LU LT. Establishment of a virus-induced gene-silencing (VIGS) system in tea plant and its use in the functional analysis of *CsTCSI*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(1): 392.
- [79] HÖRTENSTEINER S. Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(6): 505-517.
- [80] XIAO HJ, LIU KK, LI DW, ARISHA MH, CHAI WG, GONG ZH. Cloning and characterization of the pepper *CaPAO* gene for defense responses to salt-induced leaf senescence[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15: 100.
- [81] DONG C, ZHANG M, WEI F, GUO YS, QIN LL, WEI P, WANG YB, JIN LF, SONG WN, SUN T, LI F, WANG R. Inhibition of red chlorophyll catabolite reductase improved chlorophyll and carotenoid synthesis in tobacco[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2022, 148(3): 687-698.
- [82] LIU WM, LIU SY, ZHANG KY, XIE MW, SUN HW, HUANG XQ, ZHANG LX, LI M. Chlorophyllase is transcriptionally regulated by CsMYB308/CsDOF₃ in young leaves of tea plant[J]. Horticultural Plant Journal, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.12.001>.
- [83] LU SW, ZHANG MW, ZHUGE YX, FU WH, OUYANG QX, WANG WR, REN YH, PEI D, FANG JG. VvERF17 mediates chlorophyll degradation by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes in grape berry skin[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 193: 104678.
- [84] MA XM, BALAZADEH S, MUELLER-ROEBER B. Tomato fruit ripening factor NOR controls leaf senescence[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(10): 2727-2740.
- [85] YUAN XY, WANG RH, ZHAO XD, LUO YB, FU DQ. Role of the tomato non-ripening mutation in regulating fruit quality elucidated using iTRAQ protein profile analysis[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164335.
- [86] MENG LH, FAN ZQ, ZHANG Q, WANG CC, GAO Y, DENG YK, ZHU BZ, ZHU HL, CHEN JY, SHAN W, YIN XR, ZHONG SL, GRIERSON D, JIANG CZ, LUO YB, FU DQ. BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 11 regulates chloroplast development and chlorophyll synthesis in tomato fruit[J]. The Plant Journal, 2018, 94(6): 1126-1140.
- [87] TAN Y, BUKYS A, MOLNÁR A, HUDSON A. Rapid, high efficiency virus-mediated mutant complementation and gene silencing in *Antirrhinum*[J]. Plant Methods, 2020, 16(1): 1-12.
- [88] 史艳梅, 王燃, 杨军, 罗朝鹏, 李锋, 武明珠, 魏春阳, 林福呈, 屈凌波, 魏攀. 烟草类胡萝卜素异构酶基因的克隆及功能研究[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(6): 138-143.
- SHI YM, WANG R, YANG J, LUO ZP, LI F, WU MZ, WEI CY, LIN FC, QU LB, WEI P. Cloning and functional analysis of *CRTISO* gene in *Nicotiana tabacum*[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 20(6): 138-143 (in Chinese).
- [89] KILLINY N. Better together: the use of virus-induced gene silencing technique to repress the expression of two endogenous citrus genes simultaneously[J]. Plant Signaling & Behavior, 2022, 17(1): 2106079.
- [90] URSO S, ZOTTINI M, RUBERTI C, LO SCHIAVO F, STANCA AM, CATTIVELLI L, VALÈ G. An *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene silencing system for functional analysis in grapevine[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2013, 114(1): 49-60.
- [91] XIE W, MARTY DM, XU J, KHATRI N, WILLIE K, MORAES WB, STEWART LR. Simultaneous gene expression and multi-gene silencing in *Zea mays* using maize dwarf mosaic virus[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 208.
- [92] LIANG JJ, CHEN X, ZHAO HH, YU SY, LONG H, DENG G, PAN Z, YU M. The impacts of BSMV on

- vegetative growth and water status in hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*) in VIGS study[J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2015, 84: 43-51.
- [93] LIU N, XIE K, JIA Q, ZHAO JP, CHEN TY, LI HG, WEI X, DIAO XM, HONG YG, LIU YL. Foxtail mosaic virus-induced gene silencing in monocot plants[J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 1801-1807.
- [94] AGUILAR-BARRAGÁN A, OCHOA-ALEJO N. Virus-induced silencing of MYB and WD40 transcription factor genes affects the accumulation of anthocyanins in chilli pepper fruit[J]. Biologia Plantarum, 2014, 58(3): 567-574.
- [95] ZHAO Y, DONG WQ, ZHU YC, ALLAN AC, KUI LW, XU CJ. *PpGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(5): 1284-1295.
- [96] QI FT, LIU YT, LUO YL, CUI YM, LU CF, LI H, HUANG H, DAI S. Functional analysis of the ScAG and ScAGL11 MADS-box transcription factors for anthocyanin biosynthesis and bicolour pattern formation in *Senecio cruentus* ray florets[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac071.
- [97] ZHANG C, WU ZJ, LI Y, WU JG. Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1237.
- [98] TANG Y, WANG F, ZHAO JP, XIE K, HONG YG, LIU YL. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 632-641.
- [99] BORAH P, DAS A, MILNER M, ALI A, BENTLEY A, PANDEY R. Long non-coding RNAs as endogenous target mimics and exploration of their role in low nutrient stress tolerance in plants[J]. Genes, 2018, 9(9): 459.
- [100] JIAO J, WANG YC, SELVARAJ JN, XING FG, LIU Y. Barley stripe mosaic virus (BSMV) induced microRNA silencing in common wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126621.
- [101] YAN F, GUO WX, WU GT, LU YW, PENG JJ, ZHENG HY, LIN L, CHEN JP. A virus-based miRNA suppression (VbMS) system for miRNA loss-of-function analysis in plants[J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(5): 702-708.
- [102] LI TD, HU JC, SUN Y, LI BS, ZHANG DL, LI WL, LIU JX, LI DW, GAO CX, ZHANG YL, WANG YP. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture[J]. Molecular Plant, 2021, 14(11): 1787-1798.
- [103] YIN KQ, HAN T, LIU G, CHEN TY, WANG Y, YU AYL, LIU YL. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 14926.
- [104] ALI Z, ABUL-FARAJ A, LI LX, GHOSH N, PIATEK M, MAHJOUB A, AOUIDA M, PIATEK A, BALTES NJ, VOYTAS DF, DINESH-KUMAR S, MAHFOUZ MM. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system[J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1288-1291.
- [105] ARIGA H, TOKI S, ISHIBASHI K. Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2020, 61(11): 1946-1953.
- [106] WU MB, XU X, HU XW, LIU YD, CAO HH, CHAN H, GONG ZH, YUAN YJ, LUO YQ, FENG BH, LI ZG, DENG W. SIMYB72 regulates the metabolism of chlorophylls, carotenoids, and flavonoids in tomato fruit[J]. Plant Physiology, 2020, 183(3): 854-868.
- [107] MENG YY, WANG ZY, WANG YQ, WANG CN, ZHU BT, LIU H, JI WK, WEN JQ, CHU CC, TADEGE M, NIU LF, LIN H. The MYB activator WHITE PETAL1 associates with MtTT8 and MtWD40-1 to regulate carotenoid-derived flower pigmentation in *Medicago truncatula*[J]. The Plant Cell, 2019, 31(11): 2751-2767.
- [108] XU Q, LIU YL, ZHU AD, WU XM, YE JL, YU KQ, GUO WW, DENG XX. Discovery and comparative profiling of microRNAs in a sweet orange red-flesh mutant and its wild type[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 1-17.
- [109] ZHAO T, HUANG CB, LI SZ, JIA MQ, WANG L, TANG YJ, ZHANG CH, LI Y. VviKFB07 F-box E3 ubiquitin ligase promotes stilbene accumulation by ubiquitinating and degrading VviCHSs protein in grape[J]. Plant Science, 2023, 331: 111687.

(本文责编 陈宏宇)