

杨再军,张 丽,张福强,等. 基于 VIGS 技术的烤烟烟碱调控及对烟碱含量的影响[J]. 江苏农业科学,2024,52(6):61-67.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.06.008

基于 VIGS 技术的烤烟烟碱调控及对烟碱含量的影响

杨再军¹,张 丽²,张福强²,张 权²,咎建朋²,田举要²,白茂军²,徐世晓¹

(1. 河南农业大学烟草学院,河南郑州 450002; 2. 贵州省烟草公司安顺市公司,贵州安顺 561000)

摘要:在对烤烟原料要求烟碱含量低的中烟工业企业中,烟碱含量过高的烟叶难以在原料配方中适配,导致工业可用性较低。为了降低烟叶中烟碱的含量,通过病毒诱导基因沉默技术(virus induced gene silencing, VIGS)构建烟碱合成过程中 4 个关键基因(*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL*、*NtMYB305a*)的靶向沉默体系,探究瞬时沉默对基因相对表达量及烟碱含量的影响,并对不同载体的沉默效率与烟碱降低率进行贡献度分析。结果表明,通过目标序列靶片段成功构建了基于 VIGS 技术的沉默载体;T2 处理沉默 *NtPMT* 基因后,最大沉默效率为 55.23%,T3 处理沉默 *NtBBL* 基因后,沉默效率为 50.78%,两者差异不显著;各处理沉默相应基因后,不仅表现出对应基因表达量的下调,同时对本研究中其他基因的表达量也有影响;烟碱降低最多的是 T3 处理,降低率达到 39.34%,同时 T3 处理沉默 *NtBBL* 基因的沉默效率对烟碱降低的贡献度最大,为 0.775。本研究建立的 VIGS 技术体系有效沉默目的基因的表达,沉默 *NtBBL* 基因的 T3 处理沉默效率较高,烟碱含量较低,为调控烟碱含量提供了一种新思路与方法。

关键词:VIGS;烟碱;载体构建;相对基因表达量;病毒诱导的基因沉默

中图分类号:TS44⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)06-0061-07

烟碱是烟草中最重要的一类生物碱,它不仅是烟草品质的重要构成要素,还是衡量烟草烟叶品质、卷烟产品质量的一项重要指标。烟碱含量占烟草生物碱总量的 90%~95%^[1],并且烟草只有根系具有合成烟碱的能力,其中根尖皮层、表皮细胞及围绕维管束的薄壁细胞是烟碱合成的主要部位,烟草其他组织和器官并不能合成烟碱^[2]。烟草烟碱的代谢途径由吡啶环的形成、吡咯环的形成和两环结合 3 个步骤组成,目前该过程已基本明确^[3]。

在烟碱合成代谢途径中,腐胺-N-甲基转移酶(putrescine N-methyl transferase, PMT)是烟碱合成的关键控制酶^[4-5],PMT 基因只在烟草根部表达,烟碱生物合成的第 1 步是腐胺在腐胺-N-甲基转移酶(PMT)的催化作用下生成 S-腺苷甲硫氨酸、N-甲基腐胺^[6]。有研究表明,在烟草中利用消减杂交技术能一起分离得到 PMT、A622^[7],A622 是一个异类黄酮还原酶基因;小檗碱桥状酶(berberine

bridge enzyme-like, BBL)基因家族在细菌、真菌和植物中广泛存在^[8];在烟碱代谢途径的最后步骤(吡啶环和吡咯环结合)需要 PIP 家族异类黄酮还原酶类蛋白 A622 和小檗碱桥连酶类蛋白 BBL 的共同参与^[9-10]。*NtMYB305a* 是 R2R3-MYB 转录因子家族中的一员,其分子进化关系与拟南芥中的 *AtMYB21*、*AtMYB24* 分子进化最接近^[11],*NtMYB305a* 的功能是通过结合在 AT-rich 元件上来协同调控烟碱代谢途径中部分基因的表达,其中包括 *NtPMT*、*NtBBL*、*NtA622* 基因的表达,另外,*NtMYB305a* 基因表达上调或者下调都会显著影响烟草植株叶片中的烟碱含量^[12]。在烟碱代谢的调控上,虽然减少施氮量、打顶留叶等栽培措施已被证实对烟草烟碱含量具有调节作用,但是还存在实际生产应用中因人工劳务量重或经济效益差等原因导致的应用不够广泛等问题^[13]。诸多研究在探究烟碱合成途径中的基因功能时,也有使用 RNAi 或者基因敲除的方式研究基因功能,但同时针对不同基因沉默作用于烟碱含量的结果进行横向比较的报道较少。

病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)是利用 RNA 介导的植物防御病毒免疫机制而发展起来的一项诠释植物基因功能的反向遗传学技术,其内在的分子基础是转录后基因

收稿日期:2023-09-29

基金项目:贵州省烟草公司安顺市公司项目(编号:2023520400240038);

广西壮族自治区烟草公司百色市公司项目(编号:202245100020409)。

作者简介:杨再军(1998—),男,贵州瓮安人,硕士研究生,主要研究方向为烟草遗传育种。E-mail: yangzaijun528.163.com。

通信作者:徐世晓,博士,副教授,从事烟草遗传育种研究。E-mail: xushixiao@henau.edu.cn。

沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[14]。VIGS 载体具有多种选择,其中烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)载体以沉默效率高、沉默时效长、对接种植株不会造成明显伤害等优点而成为病毒诱导的基因沉默技术中选择率较高的载体^[15]。目前 VIGS 在烟草多方面均得到应用,如郭玉鸽等构建 GS 同工酶基因沉默体系,有效降低了氮代谢关键酶活性和含氮化合物含量^[16];姚怡帆等沉默烟草 *NtPPO8* 基因,降低了 PPO 活性,提高烟叶耐烤性和降低烟叶褐变比例^[17]。国内外学者关于降低烟碱含量方面开展了大量研究,但是目前以 VIGS 技术沉默不同基因来调控烟碱合成的还鲜见报道。本试验构建 3 个合成关键基因(*NtPMT*、*NtA622*、*NtBBL*)与 1 个转录因子 *NtMYB305a* 的沉默载体,以利用 VIGS 技术分别进行沉默,探究基因相对表达量与烟碱含量的关系,以及各载体沉默效率对烟碱降低率的贡献度,筛选出沉默效率较好的靶向沉默载体,以期降低烤烟烟碱含量提供理论依据,从而提高烤烟烟叶工业可用性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于 2023 年 4 月在河南农业大学科教园区烟草基地大棚内进行,材料采用盆栽种植,供试品种为云烟 87,由河南农业大学烟草学院育种实验室提供。pTRV2 载体购自武汉淼灵生物科技公司,根癌农杆菌 GV3101 与 pTRV1 购自北京擎科生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 选取沉默靶片段 根据 NCBI 上已登录的 *NtPMT* (登录号:107771646)、*NtA622* (登录号:107784748)、*NtBBL* (登录号:107791775)、*NtMYB305a* (登录号:107821652) 的序列,通过与郑州烟草研究院自建云烟 87 与 K326 的全基因组数据库对比,选取序列对比结果中的保守区段构建 VIGS 载体,根据目标序列合成 30 条引物。

1.2.2 VIGS 载体构建 利用合成的 30 条引物在高保真 PCR 聚合酶(PV2)的作用下进行 PCR,以获取克隆目标序列。扩增结果经琼脂糖凝胶电泳检测发现条带单一,而后参考 Axygen 产品说明书纯化回收目的片段,同时用 *Bam*H I/*Xho* I 对 pTRV2-*ve* 质粒进行双酶切后,获得线性化载体,将纯化回收的目的片段和 pTRV2-*ve* 线性化载体在重组酶

作用下进行重组连接。酶连后转入大肠杆菌并进行菌液涂布试验,37 ℃ 温育过夜。挑取平板中的单菌落,电泳鉴定阳性克隆,提取质粒进行测序和酶切验证。用验证正确的质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞,参照农杆菌 GV3101 使用说明方法,挑取菌落培养在 YEP 液体培养基(25 mg/L 利福平 + 50 mg/L 卡那霉素 + 25 mg/L 庆大霉素)中,取 1 μL 培养菌液进行 PCR 鉴定后分别扩繁。

1.2.3 农杆菌接种体系构建 制备 LB 培养基(50 μg/mL 利福平 + 50 μg/mL 卡那霉素),将构建成功的含病毒载体 pTRV1、pTRV2、pTRV2-*NtPMT*、pTRV2-*NtA622*、pTRV2-*NtBBL* 和 pTRV2-*NtMYB305a* 的农杆菌菌株分别接种到 LB 培养基中,28 ℃、200 r/min 恒温培养 24 h,用分光光度计调整菌液浓度($D_{600\text{ nm}}$)为 0.8 ~ 1.0,用 pTRV1 分别与 pTRV2、pTRV2-*NtPMT*、pTRV2-*NtA622*、pTRV2-*NtBBL* 和 pTRV2-*NtMYB305a* 等体积混合,取混合液 50 mL 转入离心管中高速离心,弃上清液,而后加入等体积的农杆菌浸染缓冲液(50 mmol/L 氯化钠、50 mmol/L 2-吗啉乙磺酸、0.1 mmol/L 乙酰丁香酮)中。避光 2 h 后,用 1 mL 注射器吸取含病毒载体的浸染液对 6 叶 1 心烟苗采用注射接种法浸染,注射部位为烟株嫩叶背面,主脉左右,避开支脉,每株烟苗注射左右对称的 2 张叶片,每张叶片注射面直径约 1 cm。

1.3 试验设计

试验共设置 6 个处理,处理如下:CK,不注射烟株;CK1 空载,注射接种含 pTRV2 的侵染液(空载体对照);T1,注射接种含 pTRV2-*NtA622* 的侵染液;T2,注射接种含 pTRV2-*NtPMT* 的侵染液;T3,注射接种含 pTRV2-*NtBBL* 的侵染液;T4,注射接种含 pTRV2-*NtMYB305a* 的侵染液。每个处理选取 10 株长势均匀一致的烟苗进行注射接种,每株烟苗接种 4 mL。其他盆栽管理措施保持一致。

1.4 测定指标

1.4.1 目的基因相对表达量的测定 分别在接种后 15 d 取各处理烟株根部不定根,用清水洗净后用脱脂棉吸干水分,充分消毒后经液氮冷冻,取 3 份样品作生物学重复。样本按照 RNA 试剂盒提取总 RNA,反转录 cDNA,根据选取的靶片段序列设计扩增引物(表 2)。参照 Quant qRT-PCR kit(S Y B RGreen) (TIANGEN 公司)使用说明,在 Quant Studio Tnl 6 Flex 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)上进

行各目的基因的 qRT - PCR 检测,以烟草 26S rRNA 为内参基因,作 3 次技术重复。根据检测结果中的 C_T 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析各目的基因的相对表达量。以对照组 CK 基因表达量为 1,沉默效率的计算公式如下:沉默效率 = (1 - 试验组相对基因表达量) \times 100%。

表 2 qRT - PCR 所用引物

| 引物名称 | 引物序列(5' → 3') |
|----------------------|-----------------------|
| <i>NtA622</i> - F | ACATGAGACCACCTGCCAATA |
| <i>NtA622</i> - R | ACACCTGTAGGAGGCTGAACC |
| <i>NtPMT</i> - F | GTATGCACACAGGCTGAAAGC |
| <i>NtPMT</i> - R | GTCAACTTCTGGCCCTTCAGT |
| <i>NtBBL</i> - F | TTGCCAAGGTAAGTGACGTTT |
| <i>NtBBL</i> - R | CCGTCCATCAGCATCAATAAG |
| <i>NtMYB305a</i> - F | AAGTGGGGAAACAGTGGTCT |
| <i>NtMYB305a</i> - R | AGCTGCTTGTCCATTCATGT |
| 26S rRNA - F | GAAGAAGTGCCCAAGGGTTC |
| 26S rRNA - R | TCTCCCTTTAACACCAACGG |

1.4.2 烟碱含量的测定 同时取新生叶片作杀青样,每个处理取 3 份样品作生物学重复,将烘箱温度升至 105 ℃ 后,放入叶片样品杀青 30 min,然后将烘箱温度调至 60 ℃,使叶片充分脱水并烘干至恒定干重,去除主脉、支脉,研磨过 60 目筛,采用连续流动化学分析仪(AA3,德国 Seal 公司)测定烟碱含量。烟碱含量降低率的计算公式:降低率 = (对照组烟碱含量 - 试验组烟碱含量)/对照组烟碱含量 \times 100%;沉默效率对烟碱含量降低的贡献度计算公式:贡献度 = 烟碱含量降低率/基因沉默效率。

1.5 数据分析

用 Excel 2010、DPS 7.05 软件进行相关数据统计分析,用 Duncan's 新复极差法比较不同处理间各种指标之间的差异。

2 结果与分析

2.1 VIGS 载体的构建

2.1.1 目标序列的克隆 将基因 *NtPMT*、*NtA622*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 序列通过引物合成、PCR 方法融合并克隆入载体 pTRV2 - ve。根据目标序列合成 30 条引物,通过 PCR 获取克隆目标序列,克隆鉴定每个载体的 2 个条带,结果见图 1。对 PCR 产物进行胶回收,回收产物的验证结果见图 2。

2.1.2 载体的重组连接 用 *Bam*H I / *Xho* I 处理 pTRV2 - ve 质粒,进行胶回收,在重组酶的作用下将目标序列克隆的胶回收产物进行重组连接。重组

后转化大肠杆菌并进行涂布试验,每个基因随机挑选 2 个阳性菌进行验证,结果见图 3,提取验证正确的质粒测序并进行酶切验证,结果见图 4。

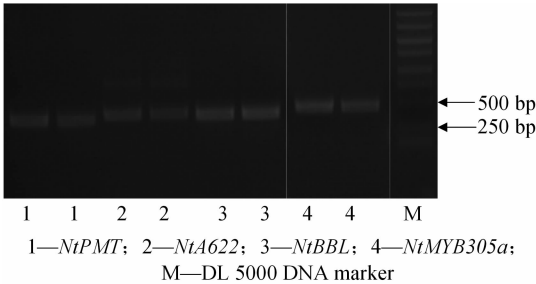


图1 目标序列克隆的电泳结果

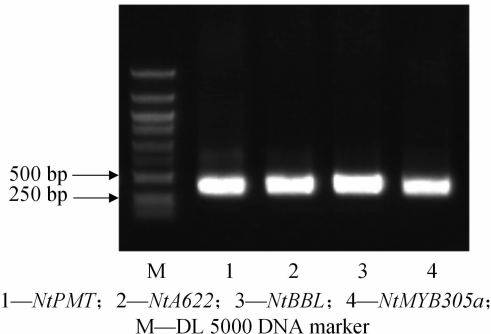


图2 胶回收验证的电泳结果

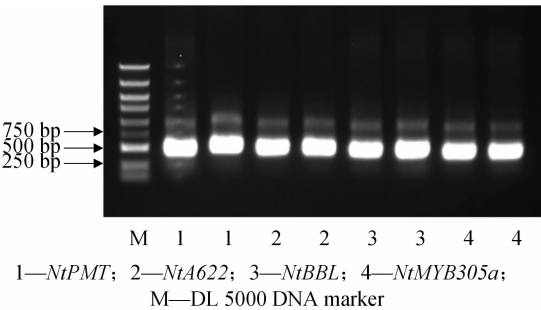


图3 转化大肠杆菌鉴定的电泳结果

2.1.3 转化农杆菌 将测序正确的质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞,转化后取 1 μ L 培养菌液进行 PCR 鉴定,结果见图 5。检测引物(位于目的片段插入位置的上、下游)序列:TRV - F,5' - CATTAGCGACATCTAAATAGG - 3'; TRV - R,5' - AACCTAA AACTTCAGACACG - 3'。

2.2 各处理的基因沉默效率分析

由图 6 可知,在接种后 15 d,各基因在 CK 与 CK1 中的相对基因表达量差异不显著,各处理对应的基因相对表达量与 CK、CK1 相比均表现下调,且与 CK 间差异显著。相较于 CK, T1 处理沉默 *NtA622* 基因后, *NtA622* 基因的相对表达量最高,与其他处理差异显著,基因沉默效率最低,为 26.54%。

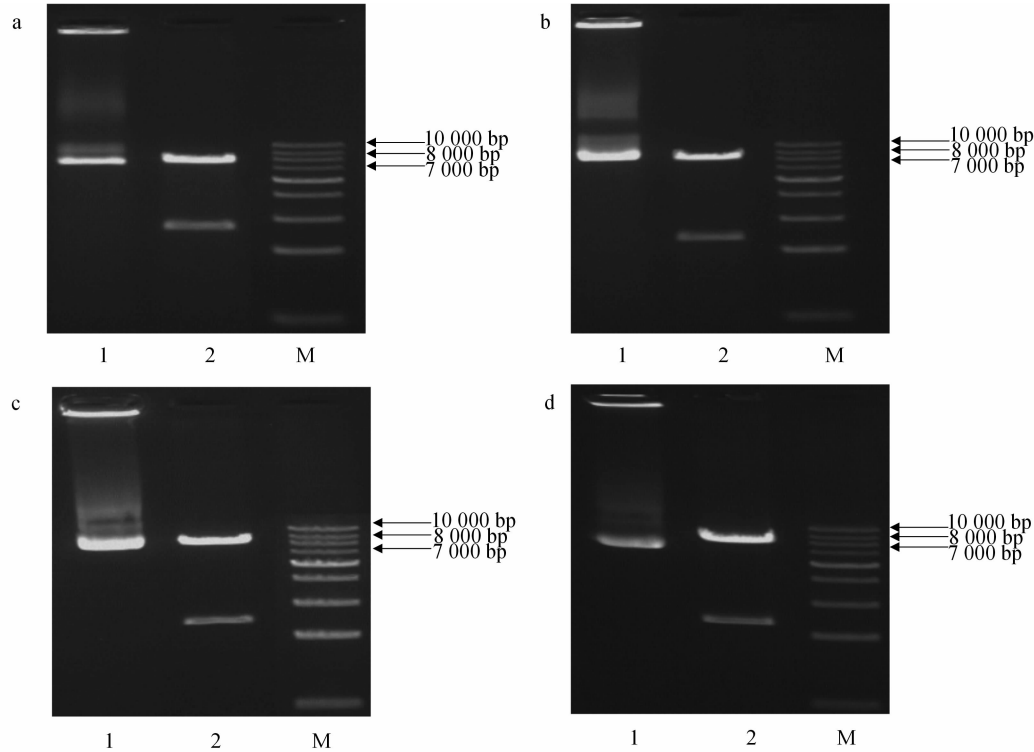


图4 质粒鉴定的电泳结果

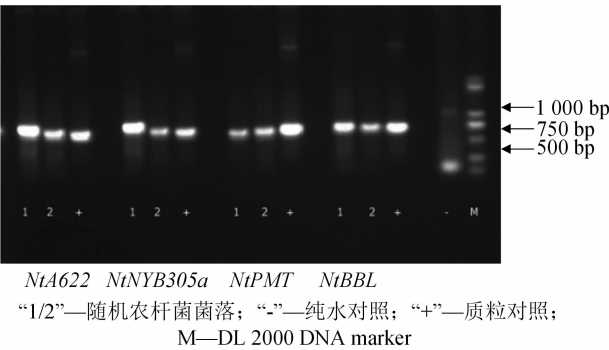
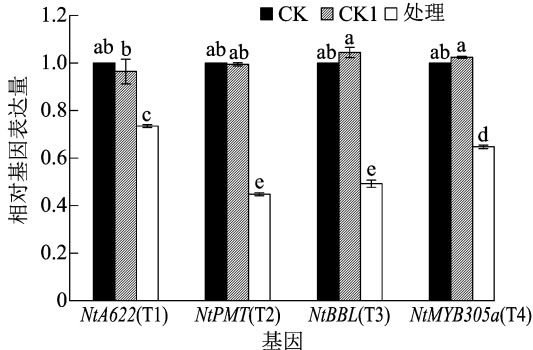


图5 农杆菌转化鉴定的电泳结果



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下图同
图6 接种后 15 d 各处理对应基因的相对表达量

理差异显著。T3 处理沉默 *NtBBL* 基因后,沉默效率为 50.78%,与 T2 处理间差异不显著。根据各处理基因相对表达量结果,沉默效果较好的是 T2、T3 处理。

2.3 沉默后相关基因表达量差异分析

由图 7 - a 可知,在 T1 处理下对 *NtA622* 基因进行沉默后,与 CK 相比,*NtPMT*、*NtMYB305a* 基因的相对表达量下调,且差异显著,*NtBBL* 基因的相对表达量上调,但差异不显著。*NtPMT*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 基因之间相对表达量差异显著,相对基因表达量较高的是 *NtBBL* 基因,相对基因表达量较低的是 *NtPMT* 基因。

由图 7 - b 可知,在 T2 处理下对 *NtPMT* 基因进行沉默后,*NtA622*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 基因的相对表达量与 CK 间差异显著,*NtA622* 基因的相对表达量上调,*NtBBL*、*NtMYB305a* 的相对表达量均下调。在 T2 处理下,*NtPMT*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 基因之间相对表达量均存在差异,相对基因表达量较高的是 *NtA622* 基因,相对基因表达量较低的是 *NtMYB305a* 基因。

由图 7 - c 可知,在 T3 处理沉默 *NtBBL* 基因后,相较于对照组 CK,*NtA622* 基因的相对表达量上调,*NtMYB305a* 基因的相对表达量下调,均差异显著,

T2 处理沉默 *NtPMT* 基因后,*NtPMT* 基因的相对表达量最低,沉默效率最高,为 55.23%,与 T1、T4 处

NtPMT 基因的相对表达量变化不大,差异并不显著。*NtA622*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 在 T3 处理中的相对表达量均差异显著,相对表达量较高的是 *NtA622* 基因,相对表达量较低的是 *NtMYB305a* 基因。

由图 7 - d 可知,T4 处理沉默 *NtMYB305a* 基因后,*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL* 基因的相对表达量均下调,且与 CK 差异显著。但在 T4 处理中,*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL* 基因相对表达量的差异并不显著。

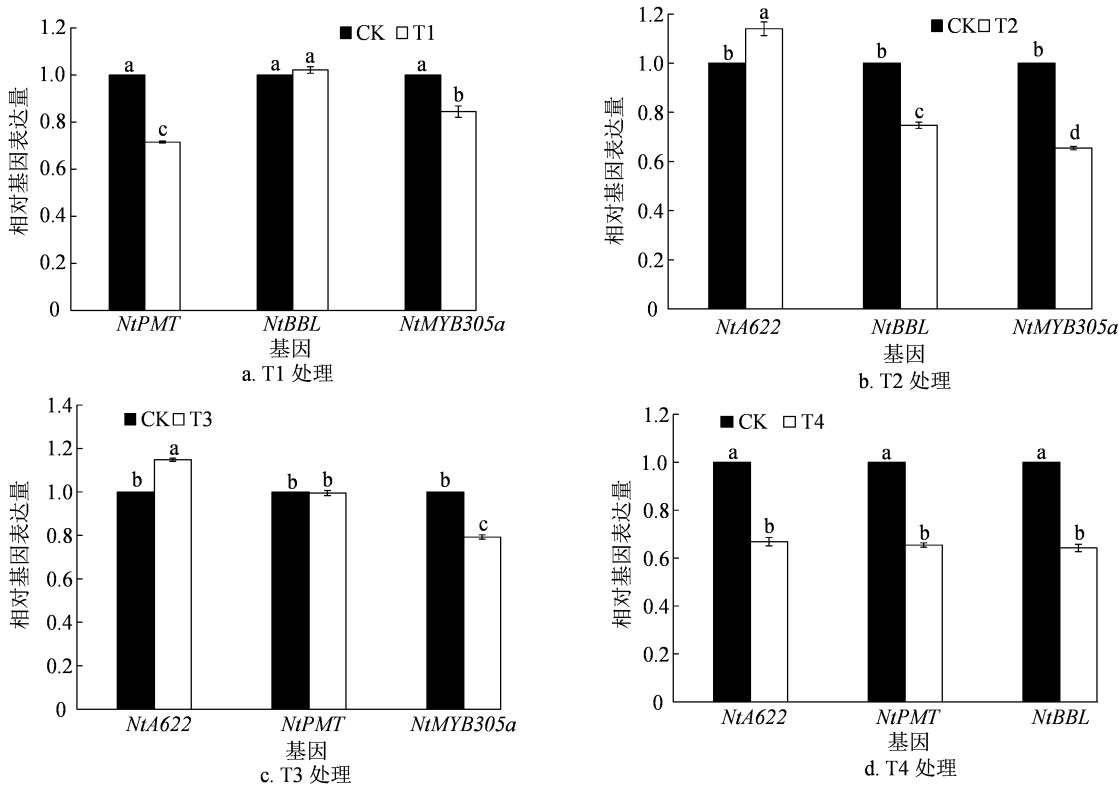


图7 接种后 15 d 各处理中不同基因的相对表达量

2.4 沉默后各处理烟碱含量的变化

烟叶烟碱含量是沉默目的基因后的最终结果,由图 8 可知,接种后 15 d,各处理的烟碱含量较 CK、CK1 都有不同程度的下降。CK、CK1 的烟碱含量变化无明显差异,其他处理的烟碱含量均与 CK 差异显著,其中烟碱含量降低最多的是 T3 处理,烟碱含量为 0.50%,降幅为 39.34%;其次为 T2 处理,烟碱含量为 0.60%;烟碱含量降低最少的是 T4 处理,烟碱含量为 0.78%,降幅为 10.82%。

2.5 各处理沉默效率对烟碱含量降低的贡献度分析

由图 9 可知,T2 处理的基因沉默效率最高,显著高于 T1、T4 处理,但与 T3 处理对应基因的沉默效率间差异不显著。各处理对应的烟碱含量有显著差异,其中烟碱含量降幅最高的是 T3 处理,显著高于其他处理。T3 处理的沉默效率对烟碱含量降低的贡献度最高,为 0.775,T4 处理的沉默效率对烟碱含量降低的贡献度最低,为 0.307;基因沉默效率与烟碱含量降低率越高,说明对烟碱含量降低的贡

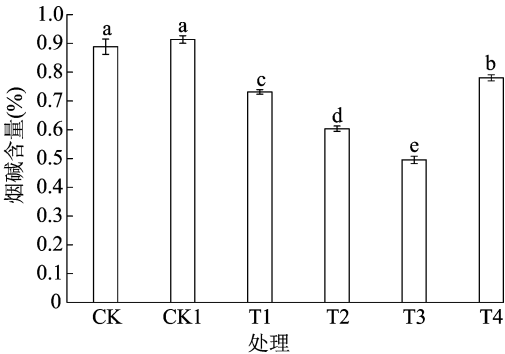


图8 接种后 15 d 各处理中的烟碱含量

献度越大,两者成正比关系。

3 讨论

烤烟烟碱含量过高的问题一直是工业企业原料配方不适配、可用性低的重要影响因素,其中烤烟上部叶烟碱含量偏高的问题尤为突出。在烤烟大田生产中,常常通过调整移栽期、种植密度、打顶高度、留叶数、氮肥施用量等^[18-19]栽培措施调控烟

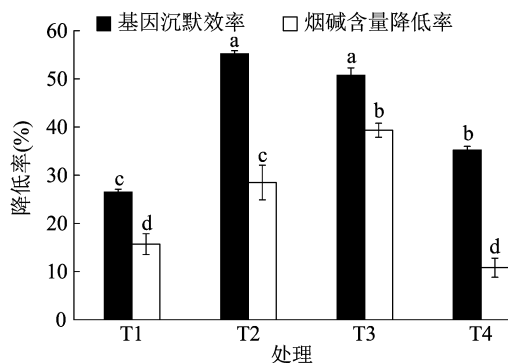


图9 各处理基因沉默效率与烟碱含量降低率

碱含量,但往往与烤烟形成的品质互相矛盾。任梦娟研究发现,用嫁接技术对烟草进行换根,可显著降低烟碱生物合成,生产无烟碱或烟碱水平极低的烟叶^[20],但烟碱含量过低的烟叶劲头小、香气量少、烟气淡而无味且无法满足工业需求^[21]。冯吉等利用 CRISPR/Cas9 技术对烟碱合成和转运的 5 个基因进行基因编辑,获得 4 种低烟碱纯合基因型 T2 代烟草植株^[22],但该技术存在易脱靶、无法对多拷贝基因编辑问题。张明月利用 RNA 干扰技术调控烟碱合成,但只是通过 *PMT* 基因的沉默来进行研究,载体单一^[23]。

本研究利用生物学技术调控烟碱生物合成,通过大量文献调研,筛选出烟碱合成中的 3 个关键基因 (*NtPMT*、*NtA622*、*NtBBL*) 与 1 个转录因子 *NtMYB305a*。通过基因序列比对,选择基因保守片段作为靶序列,通过 PCR 克隆沉默目标序列,重组连接载体,获得正确的质粒,并用该质粒转化农杆菌,成功构建了基于 VIGS 技术的 4 个基因沉默载体,利用 4 个载体成功沉默了相应基因,降低了叶片中的烟碱含量。

烟碱生物合成是代谢途径中多基因共同作用的结果^[24-25],降低合成过程中关键基因的表达量,可以降低叶片中的烟碱含量。本研究结果表明,利用 VIGS 技术体系对烟碱合成关键基因的沉默是有效的。各处理沉默后对应基因相对表达量均显著降低,其中 T2 处理沉默 *NtPMT* 基因后,其相对基因表达量降低得最多,沉默效率最大,为 55.23%;T3 处理沉默 *NtBBL* 基因后,沉默效率为 50.78%,两者差异并不显著。在本研究建立的 VIGS 体系下,各处理沉默对应基因均得到明显的沉默效果,但相互之间的沉默效果均存在差异,这与郭玉鸽等的研究结果^[26]相似。其中以 *NtPMT*、*NtBBL* 基因的沉默效率较高。

在本研究中,各处理沉默相应基因后,不仅表

现出对应基因表达量的下调,同时对本研究中其他基因的相对表达量也有影响,这与郭玉鸽等的研究结果^[16]相似。T1 处理沉默基因 *NtA622* 后,*NtPMT*、*NtMYB305a* 基因的相对表达量下调;T2 处理沉默 *NtPMT* 基因后,*NtA622* 的相对表达量上调,*NtBBL*、*NtMYB305a* 基因的相对表达量下调;前人研究发现,*A622* 参与所有生物碱合成所需的烟酸衍生物前体的形成,同时参与吡啶环、吡咯环的缩合反应^[9]。而在 *PMT* 抑制表达的植株中,烟碱合成所需的 *N*-甲基吡咯啉阳离子的丰度降低,而烟酸衍生的吡啶环代谢物的积累增多^[27],这可能是因为这些基因的功能不同,所参与的代谢物质形成具有相互调节作用。T3 处理沉默 *NtBBL* 基因后,*NtPMT* 基因表达量差异不显著,*NtMYB305a* 基因表达量下调,*NtA622* 基因表达量上调。前人研究发现,*BBL* 蛋白参与烟碱形成的最后阶段,*BBL* 的作用阶段在吡啶环和 *N*-甲基-吡咯环起始缩合之后^[28],而 *PMT* 基因主要作用是催化腐胺能够生成 *S*-腺苷甲硫氨酸、*N*-甲基腐胺^[5],所以当 *NtBBL* 基因沉默后,并不会太影响 *NtPMT* 的表达,而 *NtA622* 基因表达上调,原因是可能存在烟碱合成的次要途径,不涉及 *BBL* 活动^[29]。T4 处理沉默 *NtMYB305a* 基因后,*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL* 基因的相对表达量均下调。前人研究发现,*NtMYB305a* 对 *NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL* 基因的表达具有调节作用^[30],在茉莉酸信号途径中,可能还存在其他未知的调控因子与 *NtMYB305a* 共同参与调控烟碱代谢功能基因的表达^[31]。

烟碱含量是叶片中重要组成成分,也是本研究中不同沉默载体的直接作用结果。结果表明,各处理的烟碱含量均降低,且差异显著。各处理基因沉默后对应基因表达量趋势与烟碱含量变化趋势基本一致,其中烟碱降低最多的是 T3 处理,降低率达到 39.34%。分析各处理基因沉默效率与烟碱降低率的关系时,贡献度可以表示不同的沉默效率对烟碱降低多少的影响,其中 T3 处理沉默 *NtBBL* 基因的沉默效率对烟碱降低的贡献度最高,为 0.775。

本研究建立的 VIGS 技术体系具有成本低、方法操作简单等优点^[32],可有效沉默目标基因的表达,进而达到叶片烟碱含量显著降低的目的。有研究发现,VIGS 技术通过灌根接种法+叶部注射法对根部的特异表达基因沉默效率高达 80%^[33]。而本研究未采用灌根接种法,是考虑到烟碱是烟草特有化合物,对烤烟品质十分重要,过高过低都会影响到烤

烟品质。下一步将继续研究同时沉默不同目标基因载体对烟碱含量的影响,以达到降低烟碱含量到适中的目的,以期用于大田生产实际提供理论基础。

4 结论

本研究建立的沉默 *NtBBL* 基因的 VIGS 体系能够有效沉默目标基因的表达,基因沉默效率达 50.78%,成功降低了叶片中烟碱含量,降低率达 39.34%,并且该基因沉默效率对烟碱降低的贡献度达 0.775,为烤烟烟碱调控提供了新的思路与方法,对优质烟叶生产具有一定理论与实际意义。

参考文献:

- [1] Siminszky B, Gavilano L, Bowen S W, et al. Conversion of nicotine to normicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (41): 14919 - 14924.
- [2] Powledge T M. Nicotine as therapy [J]. PLoS Biology, 2004, 2 (11): e404.
- [3] Katoh A, Ohki H, Inai K, et al. Molecular regulation of nicotine biosynthesis [J]. Plant Biotechnology, 2005, 22 (5): 389 - 392.
- [4] Mizusaki S, Tanabe Y, Noguchi M, et al. Changes in the activities of ornithine decarboxylase, putrescine *N* - methyltransferase and *N* - methylputrescine oxidase in tobacco roots in relation to nicotine biosynthesis [J]. Plant and Cell Physiology, 1973, 14 (1): 103 - 110.
- [5] Wagner R, Feth F, Wagner K G. The regulation of enzyme activities of the nicotine pathway in tobacco [J]. Physiologia Plantarum, 1986, 68 (4): 667 - 672.
- [6] 金云峰, 李军营, 张建波, 等. 烟草烟碱代谢的生化和分子机制及其调控 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34 (4): 882 - 891.
- [7] Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, et al. Gene expression in tobacco low - nicotine mutants [J]. The Plant Cell, 1994, 6 (5): 723 - 735.
- [8] Lewis R S, Lopez H O, Bowen S W, et al. Transgenic and mutation - based suppression of a berberine bridge enzyme - like (BBL) gene family reduces alkaloid content in field - grown tobacco [J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e0117273.
- [9] Kajikawa M, Hirai N, Hashimoto T. A PIP - family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69: 287 - 298.
- [10] DeBoer K D, Lye J C, Aitken C D, et al. The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69: 299 - 312.
- [11] Song S S, Qi T C, Huang H, et al. The jasmonate - ZIM domain proteins interact with the R2R3 - MYB transcription factors *MYB21* and *MYB24* to affect jasmonate - regulated stamen development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (3): 1000 - 1013.

- [12] 卞士权. 烟草转录因子 *NtMYB305a* 调控尼古丁合成的分子机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [13] 王威威, 席飞虎, 杨少峰, 等. 烟草烟碱合成代谢调控研究进展 [J]. 亚热带农业研究, 2016, 12 (1): 62 - 67.
- [14] 曲 玲, 李彦龙, 安 巍, 等. 病毒诱导的基因沉默在茄科植物基因功能研究中的应用进展 [J]. 河南农业科学, 2018, 47 (7): 8 - 19.
- [15] 李 杰, 罗江宏, 万子龙, 等. VIGS 技术在辣椒基因功能研究中的应用进展 [J]. 河南农业科学, 2021, 50 (6): 9 - 15.
- [16] 郭玉鸽, 张路阳, 党 伟, 等. VIGS 诱导 GS 同工酶基因沉默对烤烟氮代谢的影响 [J]. 中国烟草学报, 2023, 29 (1): 79 - 87.
- [17] 姚怡帆, 代卓毅, 江智敏, 等. RNA 干扰对烟草 *NtPPO8* 基因沉默的效应分析 [J]. 作物杂志, 2022 (3): 80 - 86.
- [18] 李映相, 蔡学军, 李发平, 等. 烟草类型和栽培因素对烟株烟碱含量的影响 [J]. 湖南农业科学, 2009 (2): 39 - 41, 58.
- [19] 梁 盟. 气象因子对烤烟生物碱及其主要组分含量的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [20] 任梦娟. 基于烟茄嫁接的超低烟碱烟叶的质量变化及代谢组学分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- [21] 史宏志. 烟草生物碱与调控 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [22] 冯 吉, 程 玲, 蔡长春, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的烟草烟碱相关基因敲除及功能研究 [J]. 中国烟草科学, 2021, 42 (2): 84 - 90.
- [23] 张明月. RNA 干扰调控烤烟烟碱技术的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [24] 赵 丹. 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 降烟碱代谢调控的分子机制研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [25] 张纪利, 魏荭越, 王 景, 等. 高碳基有机肥对烤烟生长发育、病害、化学成分及经济性状的影响 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50 (20): 117 - 124.
- [26] 郭玉鸽, 张 倩, 杨惠娟, 等. 基于 VIGS 技术干扰病毒 RNA 防控烟草黄瓜花叶病毒病 [J]. 山东农业科学, 2023, 55 (6): 136 - 142.
- [27] Wang P, Zeng J, Liang Z F, et al. Silencing of PMT expression caused a surge of anatabine accumulation in tobacco [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36 (8): 2285 - 2289.
- [28] Burner N, Kernodle S P, Steede T, et al. Editing of A622 genes results in ultra - low nicotine whole tobacco plants at the expense of dramatically reduced growth and development [J]. Molecular Breeding, 2022, 42 (4): 20.
- [29] Bian S Q, Sui X Y, Wang J H, et al. *NtMYB305a* binds to the jasmonate - responsive GAG region of *NtPMT1a* promoter to regulate nicotine biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2022, 188 (1): 151 - 166.
- [30] 赵 雪. 转录因子 *MYC2* 和 *MYB305* 对烟碱合成基因的表达调控研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [31] 魏正欣, 孙 虎, 向艳涛, 等. 病毒诱导基因沉默技术在豆科植物中的应用 [J]. 中国油料作物学报, 2022, 44 (3): 497 - 502.
- [32] 金 桃, 冯 强, 万景旺, 等. 五种根际促生菌在改善植物的农艺性状方面的应用: CN201510541017.2 [P]. 2020 - 05 - 12.
- [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, 39 (7): 143 - 150.