

卜亚艇,李 伟,许燕彪,等. 基于 VIGS 的不同表达载体混合接种对烤烟烟碱代谢的影响[J]. 江苏农业科学,2025,53(3):16-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.03.003

基于 VIGS 的不同表达载体混合接种 对烤烟烟碱代谢的影响

卜亚艇¹,李 伟²,许燕彪²,谢 可²,徐秉聪²,吴剑平²,叶性荣²,
周建军²,祖琼瑶²,杨再军³,郑 聪²,徐世晓¹

(1. 河南农业大学烟草学院,河南郑州 450002; 2. 福建省烟草公司南平市公司浦城分公司,福建浦城 353400;
3. 贵州省烟草公司遵义市公司余庆分公司,贵州余庆 564499)

摘要:烟碱的代谢具有复杂的基因调控网络,其中众多基因间存在相互影响,为探究不同基因共同沉默后对烟碱代谢通路以及叶片烟碱含量的影响。使用前期构建的烟碱代谢途径中 3 个功能基因(*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL*)和 1 个调控基因(*NtMYB305a*)病毒载体,利用病毒诱导基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)技术依据基因在烟碱代谢中的作用性质和作用阶段,设置不同载体组合浸染液接种处理,测定各处理的基因相对表达量、酶活性、烟碱含量,系统分析目的基因沉默效率以及沉默后对其他基因表达的影响,并探究各处理的基因平均沉默效率对烟碱降低率的贡献度。结果表明,各处理沉默相应目的基因,会在一定程度上影响本研究其他目的基因的表达,其中 *NtA622* 基因受影响较小,而 *NtPMT*、*NtBBL* 基因受影响较大;各处理烟碱含量均得到降低,其中 D6 处理 4 个基因共同沉默后烟碱含量降低幅度最大,PMT、BBL 活性与烟碱含量趋势基本一致,A622 活性与烟碱含量趋势不完全一致;基因平均沉默效率低于烟碱含量降低率越多,说明对烟碱降低的贡献度越大,基因平均沉默效率高于烟碱含量降低率越多,说明对烟碱降低的贡献度越小。由此可知,利用 VIGS 技术可有效沉默目的基因的表达,进而降低叶片中烟碱含量,其中 4 个基因共同沉默后,烟碱含量降低最多;在烟碱代谢途径上,*NtA622* 基因相对较稳定,而 *NtPMT* 与 *NtBBL* 基因相对不稳定;PMT、BBL 活性与烟碱含量趋势基本一致。本研究为烤烟烟碱的分子调控提供了理论和技术支撑。

关键词: VIGS;混合载体;烟碱;基因表达量;酶活性;基因平均沉默效率

中图分类号: S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2025)03-0016-07

对于烟草而言,烟碱的存在是其具有独特魅力和商品价值的重要因素,作为烟草特有的活性化学成分,不仅直接影响着叶片的生理活性,还是烟草制品成瘾性的主要成分^[1-2]。烟碱的合成场所在烟株的根部,其他组织或器官均不具备合成烟碱的能力^[3]。烟碱的代谢途径已基本明确,大致可由 3 个步骤组成(图 1),包括吡啶环和吡咯环的形成以及 2 环的结合^[4]。

在烟碱代谢途径里的吡咯环形成中,腐胺 -

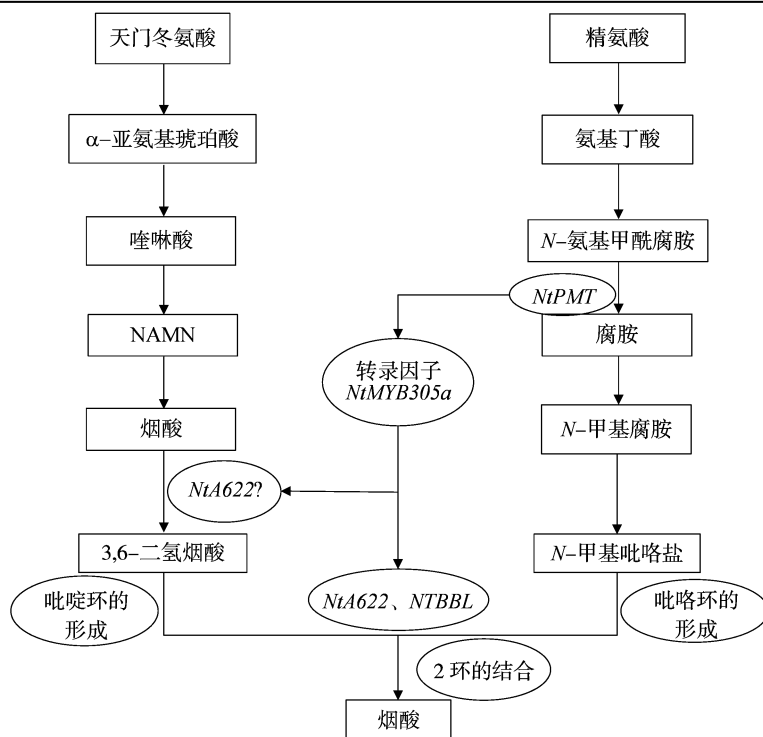
N-甲基转移酶(PMT)具有催化作用,能够催化腐胺生成 *S*-腺苷甲硫氨酸和 *N*-甲基腐胺^[6]。同时 PMT 也是烟碱生物合成的关键控制酶,控制着初级代谢产物向次级代谢产物的转化,供应烟碱合成所需的 *N*-甲基吡咯啉阳离子^[7]。*A622* 是一个异类黄酮还原酶基因,通过消减杂交技术与 PMT 一起分离得到^[8];小檗碱桥接酶(BBL)基因家族存在于细菌、真菌和植物里,该基因家族在烟碱合成途径的下游发挥作用^[9]。研究表明,PIP 家族异类黄酮还原酶类蛋白 *A622* 参与烟碱代谢途径里的吡啶环形成^[9],同时与小檗碱桥接酶类蛋白 BBL 共同参与烟碱合成的最后步骤:吡啶环与吡咯环的结合^[10-11]。在烟草中,*NtMYB305a* 属于 R2R3-MYB 转录因子家族,是拟南芥转录因子 *AtMYB21* 和 *AtMYB24* 的同源基因,研究证实 *NtMYB305a* 可以显著调控烟草中烟碱的合成,过表达或者沉默 *NtMYB305a* 会显著提高或降低烟草叶片中的烟碱含量,同时对烟草烟碱合成基因 *NtPMT*、*NtA622* 以及 *NtBBL* 的表达具有调

收稿日期:2024-07-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:32372178);福建省烟草公司南平市公司科技计划(编号:2021350700240072_2022350700240103)。

作者简介:卜亚艇(1998—),女,河南开封人,硕士研究生,从事烟草遗传育种研究。E-mail:15637855832@163.com。

通信作者:杨再军,硕士,从事烤烟生产技术研究,E-mail:yangzaijun528@163.com;郑 聪,硕士,农艺师,从事烤烟生产技术研究,E-mail:npyzc@163.com;徐世晓,博士,副教授,从事烟草遗传育种研究,E-mail:xushixiao@henau.edu.cn。



? 表示可能参与的阶段
图1 烟草烟碱代谢示意^[5]

控作用^[12-13]。烟碱的生物合成和累积受到遗传基础、生态环境、栽培措施、外源物质、采收与调制等因素的影响,然而经济效益差和工序繁琐是导致众多调节烟碱含量的措施没有得到广泛推广的主要原因^[14]。

基因沉默的本质是降低或者停止基因在植株体内的表达。病毒诱导的基因沉默(VIGS)属于转录后水平基因沉默,无需依靠转基因植株就可以在植物体内短时间且精确地完成对内源目的基因完成沉默^[15]。VIGS 技术具有高效性,通过农杆菌感染法将含目的基因片段的病毒载体导入植株中,在植株中能进行远距离传导,进而完成系统沉默,从很大程度上节约了人力物力。目前 VIGS 技术已在植物功能基因的鉴定和植物抗病抗虫基因研究中被广泛使用^[16-17]。近年来,在烟草中也有大量应用,姚怡帆等利用 VIGS 技术沉默 *NtPPO8* 基因,有效降低其基因表达量,进而降低 PPO(多酚氧化酶)活性,提高烟叶耐烤性^[18];崔露莹等构建 *NtHDZIV8* 基因的沉默载体,初步验证了该基因对烟草腺毛发育的调控作用^[19];郭玉鸽等利用 VIGS 技术将混合载体菌液接种到普通烟草中,目的基因得到不同的沉默效率^[20]。尽管有研究表明利用 VIGS 技术在本氏烟草中沉默腐胺 N-甲基转移酶基因,能够降低

本氏烟草中烟碱含量,但并没有在普通栽培烟草中进行验证^[21]。在降低烟草中烟碱含量方面,国内外研究人员在多个途径上进行了大量研究,但利用 VIGS 技术通过对烟碱代谢通路上不同基因进行组合式沉默还鲜有报道。

烟碱生物合成是受众多基因共同作用的结果,然而在烟碱代谢途径中基因发挥功能的位置不一致,并且调控基因与功能基因之间存在相互作用。因此,本研究使用笔者所在实验室已构建的 4 个 VIGS 病毒载体,依据基因性质(功能基因:*NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL*;调控基因:*NtMYB305a*)和作用阶段(*NtPMT* 作用于上游,*NtA622*、*NtBBL* 共同作用于下游)进行不同载体混合,探究各混合载体处理接种后基因相对表达量之间的差异,以及酶活性和烟碱含量的变化,从而筛选出烟碱含量降低率较高的混合接种处理,以期生物技术手段降低烤烟烟碱含量提供理论基础,提高烟叶在工业企业中的适配性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为云烟 87,含沉默目的基因片段(保守区段)的病毒载体 pTRV2 - *NtA622*、pTRV2 - *NtPMT*、pTRV2 - *NtBBL*、pTRV2 - *NtMYB305a* 以及

pTRV1、pTRV2 的原始菌液(活性良好)均由河南农业大学烟草学院育种实验室提供。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,除试验因素外,其余盆栽管理措施保持一致。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 共设置 8 个处理(表 1)。混合

载体组合依据为:3 个功能基因分别与调控基因的组合沉默(D1、D2、D3),烟碱代谢途径中下游 2 个功能基因的组合沉默以及 2 个功能基因与调控基因的组合沉默(D4、D5),3 个功能基因共同与调控基因的组合沉默(D6)。每个处理选取 10 株 6 叶 1 心时期烟苗,要求烟苗长势均匀一致无病虫害,各处理每株烟苗接种对应的 4 mL 混合浸染液。

表 1 试验处理

处理	浸染液
CK	不接种浸染液
CK1	接种含 pTRV2 的浸染液(空载体对照)
D1	接种含 pTRV2 - <i>NtA622</i> + pTRV2 - <i>NtMYB305a</i> 混合浸染液
D2	接种含 pTRV2 - <i>NtPMT</i> + pTRV2 - <i>NtMYB305a</i> 混合浸染液
D3	接种含 pTRV2 - <i>NtBBL</i> + pTRV2 - <i>NtMYB305a</i> 混合浸染液
D4	接种含 pTRV2 - <i>NtA622</i> + pTRV2 - <i>NtBBL</i> 混合浸染液
D5	接种含 pTRV2 - <i>NtA622</i> + pTRV2 - <i>NtBBL</i> + pTRV2 - <i>NtMYB305a</i> 混合浸染液
D6	接种含 pTRV2 - <i>NtA622</i> + pTRV2 - <i>NtBBL</i> + pTRV2 - <i>NtPMT</i> + pTRV2 - <i>NtMYB305a</i> 混合浸染液

1.2.2 接种体系的构建 制备 LB 培养基(50 μ g/mL 卡那霉素、50 μ g/mL 利福平),高温高压灭菌后分别接种含沉默目的基因片段的病毒载体 pTRV2 - *NtA622*、pTRV2 - *NtPMT*、pTRV2 - *NtBBL*、pTRV2 - *NtMYB305a* 以及 pTRV1、pTRV2 的原始菌液,转入摇床(28 $^{\circ}$ C,200 r/min)避光恒温培养 24 h,调整培养菌液浓度 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.8 ~ 1.0;按照各处理所需对应的混合病毒载体菌液分别与 pTRV1 等体积混合,取混合菌液 50 mL 高速离心 2 min,弃上清液,加入 50 mL 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),充分摇匀后避光 2 h 备用;采用注射接种法对各个处理烟苗的嫩叶背面进行接种,避开支脉,每株烟苗注射左右对称的 2 张叶,每张叶注射面积的直径约 1 cm。

1.3 测定指标

1.3.1 基因相对表达量的测定 取各处理接种后 15 d 的烟株根部 2 cm 长的不定根,清水洗净后去除杂质用吸水纸吸干水分,消毒后液氮冻存备用,每个处理取 3 份样品作生物学重复;将样本通过液氮研磨,参照 RNA 试剂盒说明提取总 RNA,参照北京全式金生物公司 Trans Script One - Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书反转录成 cDNA;根据目的基因片段序列设计扩增引物(表 2),以烟草 26S rRNA 为内参基因进行各目的基因的 qRT - PCR 检测,技术重复 3 次,分析检测结果中

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 CK、CK1 为试验对照组,CK 目的基因相对表达量为 1;D1 ~ D6 为试验组。

目的基因沉默效率的计算公式为:沉默效率 = (1 - 试验组目的基因相对表达量) \times 100%。

表 2 qRT - PCR 所用引物

引物名称	引物序列(5' \rightarrow 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	AAGTGGGGAAACAGGTGCTC
<i>NtMYB305a</i> - R	AGCTGCTTGTCATTTCATGT
26S rRNA - F	GAAGAAGGTCCCAAGGGTTC
26S rRNA - R	TCTCCCTTTAACACCAACGG

1.3.2 酶活性的测定 同时对根部所取样品进行研磨,加入样品体积 9 倍的提取液(pH 值 7.4 PBS 缓冲液),于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min,高速离心 30 min,取上清液待用,参照酶活性测定试剂盒说明,采用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)分别测定腐胺 *N* - 甲基转移酶(PMT)、小檗碱桥接酶类蛋白(BBL)、异类黄酮还原酶(A622)活性。

1.3.2 烟碱含量的测定 同时取各处理烟株新生顶部叶片 3 份,作生物学重复,在烘箱 105 $^{\circ}$ C 下杀青

30 min, 60 ℃ 下烘干至恒定干重; 对各处理杀青样品去除主脉和支脉, 研磨过 60 目筛, 取粉状样品 0.25 g, 加入 5% 乙酸, 振荡 30 min 后取过滤液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为: 烟碱含量降低率 = (对照组烟碱含量 - 试验组烟碱含量) / 对照组烟碱含量 × 100%。

基因平均沉默效率对烟碱含量降低率的贡献度公式为: 贡献度 = 烟碱含量降低率 / 基因平均沉默效率。

1.3 测定指标

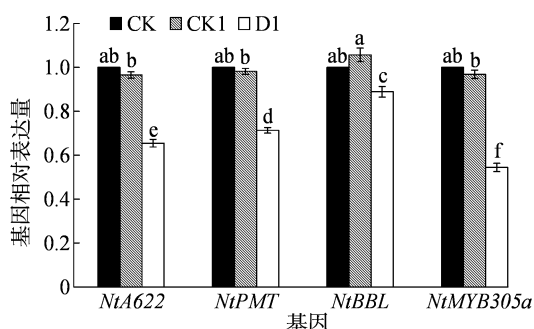
使用 Excel 2010 和 DPS 7.05 软件进行相关数据统计分析, 采用 Duncan's 新复极差法比较不同处理间测定指标的显著差异分析。

2 结果与分析

2.1 各处理沉默后相关基因表达量差异分析

由图 2 至图 7 可知, 各处理接种后 15 d, 各基因在 CK 与 CK1 中均无显著差异。

由图 2 可知, D1 处理接种后, 目的基因 *NtA622*、*NtMYB305a* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 34.55%、45.59%; *NtBBL* 和 *NtPMT* 基因均表现下调, 其中 *NtBBL* 基因下调幅度最小, 二者基因相对表达量差异显著。



图中小写字母表示在 0.05 水平差异显著, 数据为平均值 ± 标准误。下同

图2 D1 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

由图 3 可知, D2 处理接种后, 目的基因 *NtPMT*、*NtMYB305a* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 61.99%、46.59%; *NtA622* 基因相对表达量与 CK、CK1 无显著差异, *NtBBL* 基因表现下调, 各基因相对表达量之间均存在显著差异。

由图 4 可知, D3 处理接种后, 目的基因 *NtBBL*、*NtMYB305a* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 57.22%、44.02%; *NtA622* 基因相对

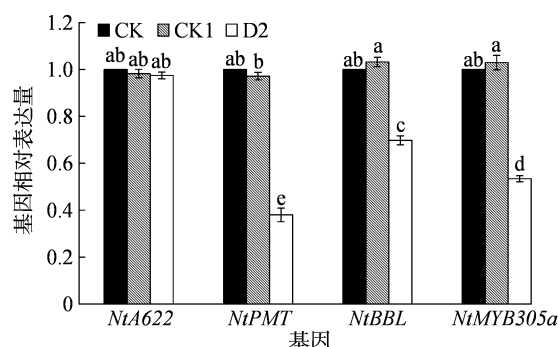


图3 D2 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

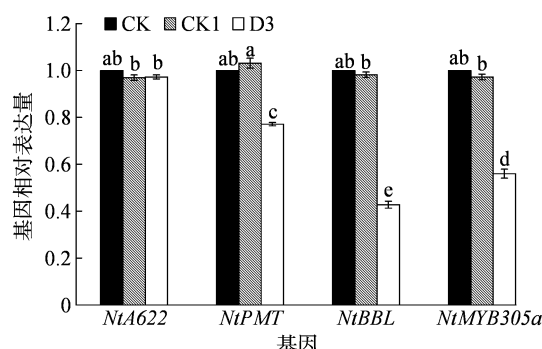


图4 D3 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

表达量与 CK、CK1 无显著差异, *NtPMT* 基因表现下调, 各基因相对表达量之间均存在显著差异。

由图 5 可知, D4 处理接种后, 目的基因 *NtA622*、*NtBBL* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 11.30%、48.44%; *NtPMT* 和 *NtMYB305a* 基因均表现下调; 各基因相对表达量之间均存在显著差异。

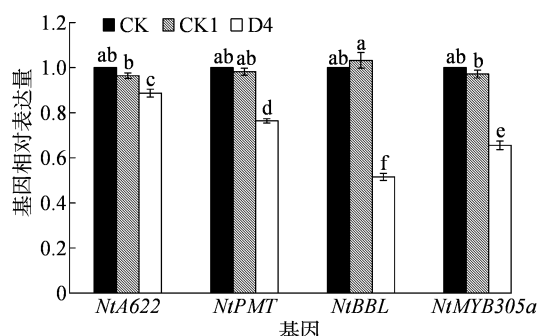


图5 D4 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

由图 6 可知, D5 处理接种后, 目的基因 *NtA622*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 20.82%、53.68%、41.07%; *NtPMT* 基因表现下调, 下调幅度低于目的基因 *NtBBL*、*NtMYB305a* 的降低幅度; 各基因相对表达量之间均存在显著差异。

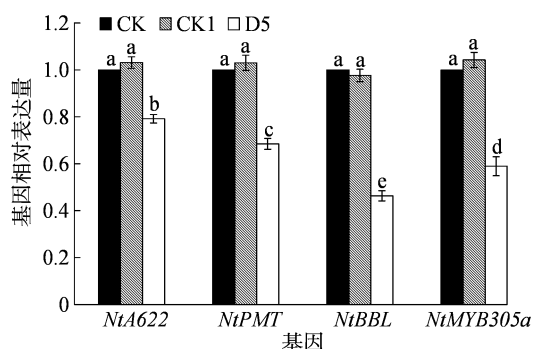


图6 D5 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

由图 7 可知, D6 处理接种后, 目的基因 *NiA622*、*NiPMT*、*NiBBL*、*NiMYB305a* 相对表达量较 CK、CK1 均显著降低, 沉默效率分别为 14.75%、61.56%、63.82%、47.02%。其中 *NiA622* 基因相对表达量最高, *NiBBL* 基因相对表达量最低, 与 *NiPMT* 基因差异不显著。

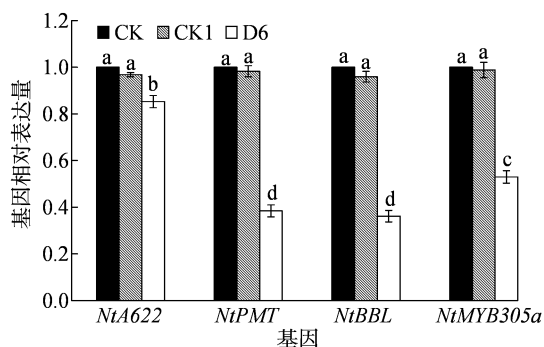


图7 D6 处理接种后 15 d 各基因的相对表达量

2.2 各处理沉默后相关酶活性的差异分析

由图 8 可知, CK 与 CK1 中 A622 活性无显著差异; 试验组 D2 处理与 D3 处理的 A622 活性较 CK 略有降低但未达到显著水平, 其余试验组较 CK 均显著降低。其中 D5、D6 处理之间的 A622 活性差异不显著, 较 CK 分别降低了 2.89、3.10 U/L, D1 处理的 A622 活性最低, 为 8.21 U/L, 较 CK 降低幅度最大, 为 3.80 U/L。

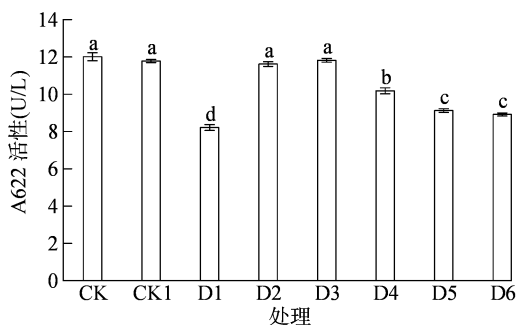


图8 接种后 15 d 各处理 A622 活性

由图 9 可知, CK 与 CK1 中 PMT 活性无显著差异, 其余试验组较 CK 均显著降低。其中 D1、D3、D4 处理之间的 PMT 活性差异不显著, 较 CK 分别降低了 1.09、1.13、1.00 U/L; D3 处理与 D5 处理之间的 PMT 活性差异不显著, D5 处理较 CK 降低了 1.47 U/L; D6 处理的 PMT 活性最低, 为 1.76 U/L, 与 D2 处理差异不显著, D2 处理与 D6 处理较 CK 分别降低了 1.93、2.05 U/L。

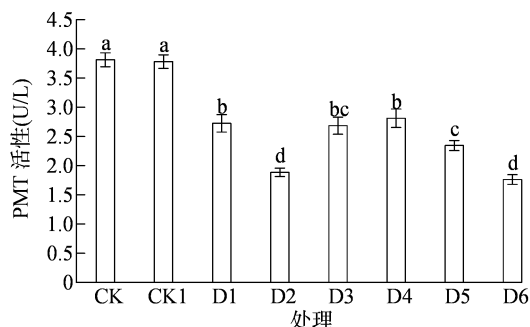


图9 接种后 15 d 各处理 PMT 活性

由图 10 可知, CK 与 CK1 中 BBL 活性无显著差异, 其余试验组较 CK 均显著降低。其中 D1 处理的 BBL 活性较 CK 降低幅度最小, 为 13.03 ng/L; D3 处理与 D5 处理之间的 BBL 活性差异不显著, 较 CK 分别降低了 57.03、59.11 ng/L; D6 处理的 BBL 活性最低, 为 72.65 ng/L, 较 CK 降低了 69.71 ng/L。

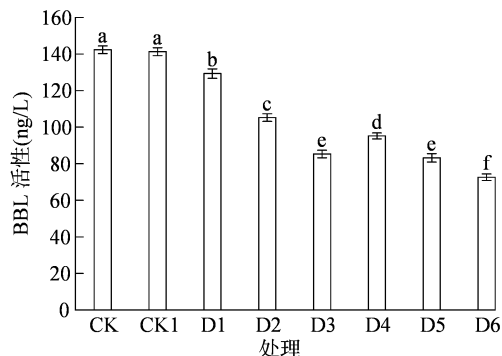


图10 接种后 15 d 各处理 BBL 活性

2.3 各处理沉默后叶片烟碱含量的差异分析

由图 11 可知, 接种混合浸染液 15 d, 各处理的烟碱含量较对照组 CK 与空载体对照组 CK1 都有不同程度的下降。其中 CK 与 CK1 的叶片烟碱含量变化无明显差异, 其余试验组叶片烟碱含量较 CK 均存在显著差异, 叶片烟碱含量降低最少的是 D1 处理, 烟碱含量为 0.72%, 较 CK 降低 21.84%; D2 处理与 D3 处理无显著差异, D3 处理与 D4 处理无显著差异; 叶片烟碱含量降低最多的是 D6 处理, 烟碱含量为 0.41%, 较 CK 降低 55.86%。

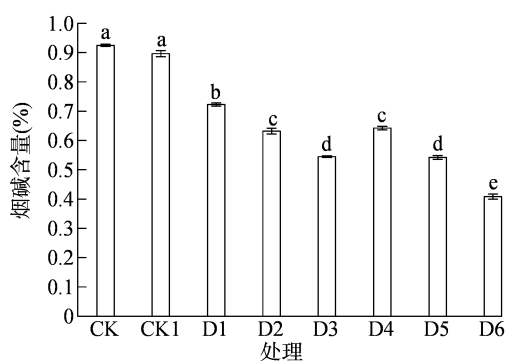


图11 接种后 15 d 各处理的烟碱含量

2.4 各处理平均沉默效率对烟碱降低率的贡献度分析

由图 12 可知, D2 处理的基因平均沉默效率最高, 与 D3 处理差异不显著, 但显著高于其他处理, D4 处理的基因平均沉默效率最低, 显著低于其他处理; D6 处理烟碱含量降低率显著高于其他处理, D1 处理的烟碱含量降低率最低。通过分析, D1 处理的基因平均沉默效率对烟碱含量的降低率贡献度最低, 为 0.545; D6 基因平均沉默效率对烟碱含量的降低率贡献度最高, 为 1.194。

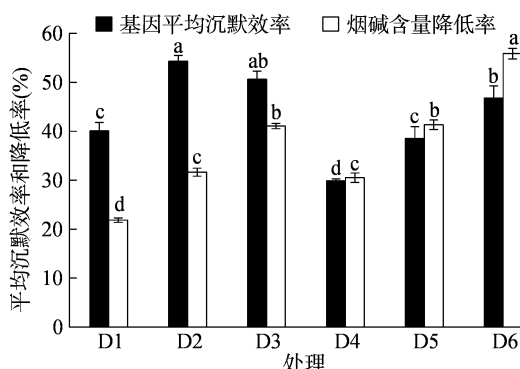


图12 各处理基因平均沉默效率与烟碱含量降低率

3 讨论与结论

烟碱生物合成调控的相关研究一直是烟草学科的前沿课题, 不同的烟草工业企业对烟叶原料的烟碱高低偏爱不一。部分烤烟种植区片面追求烟叶产量, 大量追加氮肥, 导致出现烟叶常规化学成分协调性差、烟碱含量偏高等问题^[22]。杨淳婷等通过烟茄嫁接的方法对自肋烟换根, 能够显著降低叶片中的烟碱含量, 但过多降低烟碱含量导致了烟叶香气量减少, 劲头、刺激性明显减小^[23]。张明月利用 RNAi 技术成功降低了 PMT 基因表达量, 进而降低叶片烟碱含量, 但只沉默了单一基因^[24]。

随着分子生物学的迅速发展, 针对烟碱生物合成的调控方式也不再局限于大田措施, 越来越多的调控手段开始从烟碱的代谢、转运和上游调控等方面入手。烟碱的生物合成受代谢途径中多个基因共同调控。有研究表明, 将不同基因片段同时组合到 TRV 病毒载体上, 可显著降低 2 个基因的表达量, 说明 VIGS 可用于同时沉默 2 个目标基因^[25-26]; 也有研究表明, VIGS 技术体系采用叶片接种后病毒可高效扩散到受体植株的根、茎和叶等器官, 并且在受体植株根中能检测到目的基因的表达量有效降低^[27-28]。本研究结果表明, 利用 VIGS 技术对代谢途径中 4 个关键基因分别进行组合式沉默是可行的, 成功降低了烟草根中目的基因的表达量, 进而降低叶片中烟碱含量。

本研究结果表明: D1 处理的的目的基因 *NtA622*、*NtMYB305a* 表现下调, *NtBBL* 和 *NtPMT* 基因均表现下调; D2 处理目的基因 *NtPMT*、*NtMYB305a* 表现下调, *NtA622* 基因无显著变化, *NtBBL* 基因表现下调; D3 处理目的基因 *NtBBL*、*NtMYB305a* 表现下调, *NtA622* 基因无显著变化, *NtPMT* 基因表现下调; D4 处理的的目的基因 *NtA622*、*NtBBL* 表现下调, *NtPMT* 和 *NtMYB305a* 基因均表现下调; D5 处理的的目的基因 *NtA622*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 表现下调, 而 *NtPMT* 基因也表现下调; D6 处理的的目的基因 *NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL*、*NtMYB305a* 均表现下调。综上所述, 表明 *NtMYB305a* 沉默后会导致其他目的基因的表达下调, 这与卞士权的研究结果^[29]相似, *NtMYB305a* 可以对 *NtA622*、*NtPMT*、*NtBBL* 基因的表达进行调控; 各处理沉默相应目的基因后, 会在一定程度上影响本研究中其他目的基因的表达, 这与郭玉鸽等的研究结果^[20]相似。根据本研究各处理沉默后各基因表达量的差异分析, *NtA622* 基因的表达受其他基因的影响较小, 原因可能是 *NtA622* 不仅参与吡啶环与吡咯环的结合, 还参与其他生物碱合成的吡啶环形成途径中烟酸衍生物前体的形成^[11]。*NtPMT* 基因的表达受其他基因的影响较大, 有研究表明, *NtPMT* 基因主要作用是在吡咯环形成途径中催化腐胺能够生成 S-腺苷甲硫氨酸和 N-甲基腐胺^[30], 是烟碱代谢途径中的上游基因; *NtBBL* 基因的表达受其他基因的影响也较大。BBL 蛋白虽然参与烟碱形成的最后阶段, 但 *NtBBL* 的作用阶段是在吡啶环和 N-甲基-吡咯环起始缩合之后, 这个阶段属于烟碱代谢途径中的下游^[31]。

本研究结果表明, PMT、BBL 活性与烟碱含量趋势基本一致, A622 活性与烟碱含量趋势不完全一致, 各处理的烟碱含量均显著降低, 表明各处理沉默对应基因后对叶片烟碱含量的降低是有效果的, 且蒲媛媛研究认为, A622 活性与烟碱含量达到显著正相关, BBL 活性与烟碱含量呈负相关^[32], 本研究结果与之略有差异; 有研究表明, PMT 活性与烟碱含量成正比^[7], 本研究结果与之一致。

贡献度可以表示混合载体接种后的目的基因平均沉默效率对烟碱含量降低多少的影响力。本研究通过分析各处理基因平均沉默效率与烟碱降低率的关系, 表明基因平均沉默效率低于烟碱含量降低率越多, 说明对烟碱降低的贡献度越大; 基因平均沉默效率高于烟碱含量降低率越多, 说明对烟碱降低的贡献度越小。

本研究建立的 VIGS 技术体系同时沉默 4 个目的基因的表达, 基因平均沉默效率 46.78%, 进而有效降低烟碱含量, 烟碱含量降低率 55.85%, 平均沉默效率对烟碱降低的贡献度达 1.194。在烟碱代谢途径上, *NtA622* 基因相对较稳定, 而 *NtPMT* 与 *NtBBL* 基因相对不稳定; PMT、BBL 活性与烟碱含量趋势基本一致。本研究进一步为烟碱合成的生物调控提供理论基础, 对于烟草栽培和育种工作等有重要科学意义。

参考文献:

- [1] Fowler C D, Gipson C D, Kleykamp B A, et al. Basic science and public policy: informed regulation for nicotine and tobacco products [J]. *Nicotine & Tobacco Research*, 2018, 20(7): 789–799.
- [2] Smith T T, Rupprecht L E, Denlinger – Apte R L, et al. Animal research on nicotine reduction: current evidence and research gaps [J]. *Nicotine & Tobacco Research*, 2017, 19(9): 1005–1015.
- [3] Katoh A, Ohki H, Inai K, et al. Molecular regulation of nicotine biosynthesis [J]. *Plant Biotechnology*, 2005, 22(5): 389–392.
- [4] Powledge T M. Nicotine as therapy [J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(11): 404.
- [5] Dewey R E, Xie J H. Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 94: 10–27.
- [6] 金云峰, 李军营, 张建波, 等. 烟草烟碱代谢的生化及分子机制及其调控 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(4): 882–891.
- [7] 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.
- [8] Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, et al. Gene expression in

- tobacco low – nicotine mutants [J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(5): 723–735.
- [9] 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.
- [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(3): 299–312.
- [11] Kajikawa M, Hirai N, Hashimoto T. A PIP – family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(3): 287–298.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Ratcliff F, Martin – Hernandez A M, Baulcombe D C. Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(2): 237–245.
- [16] Chandan R K, Singh A K, Patel S, et al. Silencing of tomato *CTR1* provides enhanced tolerance against tomato leaf curl virus infection [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(3): e1565595.
- [17] Zhou X H, Liu J, Bao S Y, et al. Molecular cloning and characterization of a wild eggplant *Solanum aculeatissimum* *NBS – LRR* gene, involved in plant resistance to meloidogyne incognita [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 583.
- [18] 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.
- [19] 崔露莹, 陈明丽, 余文, 等. 烟草 *NtHDZIV8* 基因在腺毛发育中的功能验证 [J]. *中国烟草科学*, 2023, 44(2): 7–14.
- [20] 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.
- [21] Takizawa M, Hori K, Inai K, et al. A virus – induced gene silencing approach for the suppression of nicotine content in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Biotechnology*, 2007, 24(3): 295–300.
- [22] 薛刚, 杨志晓, 张小全, 等. 不同氮肥用量和施用方式对烤烟生长发育及品质的影响 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21(6): 98–102.
- [23] 杨淳婷, 冯雨晴, 李玉静, 等. 白肋烟与茄子嫁接对烟叶生物碱等化学成分含量和感官质量的影响 [J]. *河南农业大学学报*, 2022, 56(5): 750–758.
- [24] 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.

朱子琳,李锋刚,张亚萌,等. 兰州鲇皮肤与脾转录组比较及 *Galectin-3* 与 *LITAF* 基因分子特征分析[J]. 江苏农业科学,2025,53(3):23-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.03.004

兰州鲇皮肤与脾转录组比较及 *Galectin-3* 与 *LITAF* 基因分子特征分析

朱子琳^{1,2}, 李锋刚², 张亚萌², 周继术¹, 杨元昊²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院,陕西杨凌 712100; 2. 陕西省水产研究与技术推广总站,陕西西安 710086)

摘要:兰州鲇(*Silurus lanzhouensis*)是黄河中上游特有土著鱼类,其自然种群数量稀少,已被列入《中国物种红色名录》。为了解兰州鲇皮肤和脾 2 个重要免疫器官在免疫过程中发挥的不同功能,本研究以野生兰州鲇作为研究对象,对其皮肤和脾进行转录组测序分析。结果表明,兰州鲇的皮肤和脾中共有 6 627 个差异表达基因(DEG)。KEGG 富集分析结果表明,共有 59 个 DEG 富集到 Toll 样受体信号通路、RIG-I 样受体信号通路等 11 个免疫相关通路中。这表明兰州鲇的皮肤与脾的免疫功能有较大差异。通过 DEG 分析,还发现半乳糖凝集素 3(*galectin-3*)及脂多糖诱导的肿瘤坏死因子(LITAF)2 个先天免疫相关基因发生了显著的差异性表达。组织表达模式分析结果表明,*galectin-3* 是兰州鲇皮肤高表达基因,而 *LITAF* 基因在 6 个组织中均有表达,显示出 *galectin-3* 主要在兰州鲇皮肤屏障的先天免疫中发挥着重要的免疫防御作用,而 *LITAF* 则广泛参与兰州鲇机体的免疫防御。通过多序列比对及蛋白质结构预测可知,*Galectin-3* 与 *LITAF* 的氨基酸序列在硬骨鱼中是保守的。

关键词:兰州鲇;皮肤;脾;转录组;*galectin-3*; *LITAF*;蛋白质结构及功能预测

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)03-0023-12

皮肤被认为是鱼类的黏膜组织^[1],是硬骨鱼类重要的外周免疫器官^[2-3],也是鱼类抵御不良外界环境的第一道防线^[4]。脾是硬骨鱼类的淋巴结样器官^[5],具有造血和免疫双重功能^[6],其主要通过免疫淋巴细胞、补体和免疫球蛋白等发挥免疫功

能^[7],在清除入侵病原体 and 启动特异性免疫反应中起不可替代的作用^[5]。半乳糖凝集素是一类进化保守的蛋白质,在脊椎动物中广泛存在^[8],目前也在多种无鳞硬骨鱼皮肤黏液中分离获得^[9-11]。*Galectin-3* 是半乳糖凝集素的一种,可以作为细胞的模式识别受体(PRR)^[12],参与针对入侵病原体的免疫反应,还可以激活或调节先天免疫细胞^[13],参与中性粒细胞向炎症部位的迁移及病原体的清除过程^[14-15]。脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- α (LITAF),在脊椎动物和无脊椎动物组织广泛存在^[16-18],在炎症和自身免疫性疾病中发挥着重要的作用^[19]。研究认为,LITAF 可通过 MyD88 信号通路参与促炎反应,作为炎症细胞因子 TNF- α 的转

收稿日期:2024-02-29

基金项目:农业农村部财政专项(编号:HHDC-2022-0302)。

作者简介:朱子琳(2000—),女,山东临沂人,硕士研究生,主要从事鱼类种质资源研究与应用。E-mail:zhuzil01@163.com。

通信作者:周继术,博士,副教授,主要从事水产动物营养与饲料科学研究,E-mail:zhoujishu@163.com;杨元昊,硕士,正高级工程师,主要从事濒危鱼类保护与水产品质量安全,E-mail:yuanhao_y@126.com。

[25]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.

[26]Zhu F,Che Y P,Xu F,et al. Simultaneous silencing of two target genes using virus-induced gene silencing technology in *Nicotiana benthamiana*[J]. Journal of Biosciences,2019,74(5/6):151-159.

[27]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.

[28]王心宇,吕坤,蔡彩平,等. TRV 病毒介导的基因沉默体系在棉花中的建立及应用[J]. 作物学报,2014,40(8):1356-1363.

[29]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.

[30]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.

[31]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.

[32]蒲媛媛.烟碱合成途径中关键酶活性对杂种优势形成的影响[D]. 贵阳:贵州大学,2020.