

木瓜後熟果實之 VIGS 系統建立

楊秋鈴¹⁾ 徐敏記²⁾ 潘怡君³⁾

關鍵字：木瓜、VIGS、PDS、後熟

摘要：果實的後熟是重要採後生理機制，也是影響果實商品價值的關鍵反應。然而果樹之基因轉殖困難且耗時，後熟生理相關基因之功能研究相對較為困難。病毒誘導基因靜默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 系統是快速有效靜默基因表現的方法，也是研究植物基因功能常見的工具。木瓜是更年性果實，也是台灣重要經濟水果，本實驗以木瓜為材料建立後熟果實之 VIGS 實驗系統，利用菸草脆裂病毒 (Tobacco Rattle Virus, TRV) 載體構築木瓜 *CpPDS* 基因片段，進行催熟木瓜之 VIGS 處理。實驗結果顯示以斜插注射方式進行果實接種，可以在接種 3 天後成功降低 70~81% 的 *CpPDS* 基因表現量，並使類胡蘿蔔素含量減少約 21%。本研究成功建立催熟木瓜之最佳接種模式，釐清 VIGS 反應及靜默基因的時間與位置效應。建立木瓜後熟果實之 VIGS 系統除了有助於後熟相關基因功能與果實生理之研究，也有助於其他更年性果實的後熟機制生理之研究。

前 言

VIGS 為 Virus-induced gene silencing 的縮寫，屬於一種轉錄後基因靜默的機制，藉由將植物表現的 mRNA 降解的方式，降低蛋白質的轉譯而達到使基因「安靜又沉默」的效果。這項技術借鏡於植物的轉錄後基因靜默作用 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)，意即植物為了防止病毒感染，針對病毒複製出來的核酸片段截切及降解，進而抑制病毒基因表現量的機制 (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998; Hamilton and

-
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
 - 2) 政院農業委員會農業試驗所作物組助理研究員。
 - 3) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

Baulcombe, 1999; Voinnet *et al.*, 1999; Baulcombe, 2004)。VIGS 之原理是在去除致病能力的病毒載體上構築目標基因，再將病毒體導入農桿菌中，藉由農桿菌將外來基因組傳送至植物細胞，達到靜默目標基因的目的。菸草脆裂病毒 (Tobacco Rattle Virus, TRV) 屬於 RNA 病毒，為多物種及組織間最具廣泛感染能力的病毒 (Ratcliff *et al.*, 2001)，而 TRV 病毒載體也被廣泛運用於各種作物上。多篇回顧文獻整理出其作用機制：藉由其病毒載體上 TRV1 載體製造 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 蛋白，將單股的 TRV2 RNA (ssRNA) 載體合成雙股的 RNA (dsRNA)，而 dsRNA 會被包裹在病毒蛋白中，藉由病毒的移動蛋白運送至不同細胞或組織，將 dsRNA 傳送到整棵植物之細胞內。植物細胞核偵測到 dsRNA 時生合成 endoribonuclease Dicer 或是含有 RNase motif 的 helicase，將 dsRNA 截切成小片 RNA。小片段的 RNA 與植物中的蛋白複合物 RISC (RNA-induced silencing complex) 組織成複合體，辨識到可以與小片段的 RNA 互補結合的目標的病毒 RNA 後將其降解。而 RISC 蛋白複合物在植物體中可以被回收使用，並且降解後剩餘的小片段 RNA 能夠再被病毒的 RdRp 蛋白合成 dsRNA，形成反饋而放大降解 mRNA 的效果 (Burch-Smith *et al.*, 2004; Becker and Lange, 2010; Shi *et al.*, 2021)。在應用上可先去除 TRV 載體致病力並改良其複製效率而成為應用載體，TRV 載體已是廣泛是用在不同作物中的 VIGS 載體 (Hamilton and Baulcombe, 1999; Liu and Page, 2008; Shi *et al.*, 2021)。只需要將目標基因的片段構築至 TRV2 載體中與 TRV1 共同感染植物，即可使植物目標基因降解，進而達到病毒誘導基因靜默 (VIGS) 之效果。相較於基因轉殖系統，VIGS 系統具有方便、快速、效果顯著，且不會改變植物基因組等許多優勢。

為了測試 VIGS 系統在植物中作用的有效性，許多研究皆將植物的 *PDS* (*Phytoene Desaturase*) 基因片段構築在 TRV2 載體中進行試驗 (Fu *et al.*, 2005; Hileman, *et al.*, 2005; Burch-Smith *et al.*, 2006; Senthil-Kumar *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012)。*PDS* 基因編碼的蛋白參與類胡蘿蔔素的生合成途徑，將 *PDS* 基因靜默後使類胡蘿蔔素生合成減少，植物葉片缺乏類胡蘿蔔素保護下之葉綠素受光照產生降解，進而使植物葉片呈現白化的現象 (Wang *et al.*, 2009)。因此許多建立 VIGS 系統的實驗皆將 *PDS* 基因設定為目標靜默基因，可在 VIGS 成功作用後觀察到明顯的葉片白化效果。

後熟是許多果實重要的生理過程，精準調控果實後熟的時間與程度是提高果實商品價值的重要關鍵。然而因為果樹作物之基因體複雜、幼年期長的特性，基因轉殖通常較為困難且極為耗時，因此針對果實後熟相關基因功能之研究較為缺乏。而 VIGS 不需建立轉殖系統，也不需等待園藝作物開花結果，可直接降低果實之目標基因表現量，為研究果實後熟相關的調控基因功能之快速可行的方式。木瓜在臺灣是重要的經濟果樹，出貨前常利用乙烯或電石催熟的方式，使果實轉色、軟化速度一致。本實驗利用催熟後的木瓜果實進行 *CpPDS* 基因之 VIGS，以了解 VIGS 在木瓜後熟果實不同部位的傳播能力及靜默基因所需之時間及其效果。建立木瓜後熟果實之 VIGS 系統，將有助於未來木瓜與其他更年性果實後熟相關基因之功能研究。

材料與方法

一、試驗材料取得及催熟處理

試驗使用台農二號木瓜，自台灣嘉義縣悠沃農場 (N23.4168°, E120.3828°)取得，於 2022 年 10-12 月間自田間採收後於三小時內運送至實驗室並進行實驗。採收挑選成熟度處於綠熟期 (green-ripen stage)之果實進行試驗：果皮外觀仍為綠色，但已有 1-2 條果溝略呈淡黃色，果肉尚未軟化但已呈淡橙色 (轉色 25%以內)之木瓜果實，果實重量約 850-1200g。每顆果實使用舒果網包覆後，置於採收用掛耳籃 (長 61.5cm、寬 42.5cm、高 38cm)中，另在底部墊上緩衝塑料以避免壓傷。接著將每籃約 20 顆，共計三籃的果實封閉於大型壓力箱中 (3.24m³)，並打入純乙烯 (ethylene)使箱內乙烯濃度達 100ppm。同時在箱內放置導流風扇，使箱內氣體均勻流動，於 25°C暗環境中催熟 16 小時後進行後續試驗。

二、VIGS 載體構築

以阿拉伯芥的 PDS 蛋白 (NP_193157.1)在 NCBI 中進行 blastp 與木瓜的蛋白資料庫進行比對，搜尋比對後最相似的 PDS 蛋白，獲取其 mRNA 序列 (DQ666830.2)。設計含有 SacI 限制酶的專一性引子擴增木瓜樣品中的 PDS mRNA。接著將擴增後獲得的 PDS mRNA 片段與 TRV2 載體，依照 SacI (Thermo)說明書的方式進行 SacI 限制酶截切。截切後的溶液經過膠體電泳的方式，在 UV 光桌下將將截切產物與其他片段分離，使用純化 kit (MPG-01300, Gel Extraction and PCR Clean UP Kit)進行樣品的純化。純化後的產物依照比例配置，利用 T4 DNA Ligase (M1801, Promega)於 4°C環境下作用 16 小時進行接合。構築完成之載體經過定序確認後，以電菌方式送進農桿菌株，以利後續接種使用。

三、VIGS 接種

挑選欲接種之 TRV1、TRV2、TRV2-*CpPDS* 農桿菌菌株單一菌落，以含有 100ppm Kanamycin 的 5 mL LB 養液於 28°C培養一天。接著將培養後的菌液倒入含有 100ppm Kanamycin、100 μM AS 的 25 mL YEP 養液放大培養一天。將菌液離心後以懸浮液 (10 mM MgCl₂、10 mM MES、200 μM Acetosyringone) 回溶並調到 O.D.值為 1，再度置於 28°C培養 3 小時後進行注射。注射前將 TRV1 及 TRV2-*CpPDS* 懸浮菌液以等比例體積混和，另外以混合 TRV1 及 TRV2 空載體的懸浮菌液作為對照組。使用以下三種方式在果實約中段到下方部位進行接種：1 mL 針筒垂直方式多點插入 3 mm 深度、以斜插方式平行表皮方向插入注射、亦或用砂紙些微磨去表皮角質層再以衛生紙濕敷菌液。接種後的果實放置於 25°C、RH 90%無光生長箱中 3 天。後續蒐集斜插注射處理的木瓜，距離接種處不同遠近的四個位點 (圖 2A)樣品進行分析。

四、RNA 萃取及反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

將木瓜樣品以液態氮研磨成細粉並秤取 0.1 g 後，依照 TRIzol (Invitrogen, USA)說明書的方式進行萃取。將萃取完成的 RNA 以無菌的 DEPC ddH₂O 調整至 1 μg。使用並依照

其 (RT-0100, EBL Biotechnology) 說明書方式反轉錄成 cDNA。而為了偵測病毒載體的表現, 使用該載體專一性的引子並依照其說明書方式將病毒載體表現的 RNA 反轉錄成 cDNA。TRV1 所使用的引子序列為 GAATTGTTTGTGGACGGTAGGAGG 及 CGCCTAGTCGAATCAGTAGCAACC; TRV2 所使用的引子序列為 CGGTAGAACGTCCTTATCCAACACA 及 AGAATCGTCCATCAAGTCAGCAGG。將反轉錄後的 cDNA 以專一性引子進行 PCR 擴增, 依照說明書的方式配置反應溶液 (EBL PCR Master Mix (2X), MCT-01125, EBL Biotechnology), 且擴增所調整的部分為: T_m 值為 53°C、延長時間 (extension time) 為 33 sec、cycles 數為 35。測量病毒載體表現量所使用的引子與反轉錄使用的引子相同。

五、即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction) 分析

將合成的樣品 cDNA 稀釋至 20ng/μL, 以 iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) 方法配製反應溶液: 在反應槽中加入 100ng 的樣品 cDNA、10 μl iQTM supermix (2x)、300nM 欲測基因之正向引子 (forward primer) 和反向引子 (reverse primer), 封膜後放置於即時定量聚合酶鏈鎖反應儀 (CFX ConnectTM, Bio-Rad, USA) 進行反應。*CpEF1a* 參考基因 (reference gene) 所使用的引子序列為 ACCTGTTGGTTGTATACGTTGCTGG、GCAGCATTTTTGGTCCATAAGGC, 而 *CpPDS* 基因所使用的引子序列為 GTTGCAGTGGAAGGAGCACTCAAT、CCTCAACATACTCCTGTCCACCGA。*CpPDS* 基因表現量的計算如下: 以每樣品中測得之 *CpEF1a* 參考基因 (reference gene) Ct 值作為標準化 (normalization) 之基準, 將 *CpPDS* 基因測得之 Ct 值依照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 計算相對基因表現量。統計計算以 one-way ANOVA 計算組之間的差異, 事後檢定 (post-hoc test) 採用 Tukey HSD, 在 p-value < 0.05 為顯著, 並以小寫英文字母標記。

六、總類胡蘿蔔素含量測定

取 0.1 g 等量重樣品, 加入 5 ml pure Acetone (9005-68, J.T.Baker, 4°C) 研磨均質, 避光放置在 4°C 中反應 16 小時, 以 12,000 xg、4°C 離心 5 分鐘。接著使用 0.22 μm filter 過濾後, 測定 470、662、645、750 nm 四種波長之吸光值。每組 3 顆果實, 於採樣部位各測量 5 次。將 470、662、645 nm 讀值與 750 nm 讀值相減進行標準化, 並參考 Lichtenthaler 及 Buschmann (2001) 的公式: 總類胡蘿蔔素濃度 (μg/ml) = $(1000 * A_{470} + 243.2006 * A_{662} - 1267.1377 * A_{645}) / 214$ 計算, 再將計算所得的濃度 x 萃取體積 (mL) / 樣品重 (g) 得到總類胡蘿蔔素含量 (μg/g) (Lichtenthaler and Buschmann, 2001)。統計計算以 one-way ANOVA 計算組之間的差異, 事後檢定 (post-hoc test) 採用 Tukey HSD, 在 p-value < 0.05 為顯著, 並以小寫英文字母標記。

結 果

一、木瓜果實的 VIGS 接種方式

成熟的木瓜果實中，主要顏色組成分為類胡蘿蔔素 (Shen, et al. 2019)。為了將 VIGS 系統應用在木瓜果實中，設計載體攜帶的目標基因為類胡蘿蔔素生合成的上游蛋白 *CpPDS*，並將混合的農桿菌液以垂直注射、斜插注射或磨皮濕敷等三種方式進行接種。接種後第 1 天即可觀察到接種部位顏色的差異 (圖 1B)。觀察注射傷口處，以垂直注射及磨皮濕敷法產生較大的傷口，產生較多的滲漏組織液並凝固在表面，注射後影響顏色的效果也不顯著 (圖 1C)。磨皮濕敷法相較其他兩種處理，在處理後第 1 天快速轉色 (圖 1A)。而斜插注射的方式產生的傷口最小，相對處理組在第 3 天有最明顯影響顏色的效果 (圖 1B、1C)，顯示三種方法之中以斜插注射的方式最適合用來接種 VIGS。

二、*CpPDS* 基因靜默效果持續傳播 3 天

斜插注射產生最小傷口及最明顯顏色變化，因此利用斜插處理之果實進行後續實驗，以瞭解 VIGS 在果實中的傳播時間與效果。收取接種正面及背面共 4 個位點的木瓜果肉樣品進行分析，四個位點之位置如圖 2 所示，以正面接種部位為 L1 (Location 1)、正面接種上端的 L2、接種背面的 L3、及背面上方距離接種部位最遠的 L4 位點 (圖 2A)。相對於對照組，VIGS 處理組在第 3 天時的 L1 部位顏色較淺 (圖 2B)。偵測四個位點的 TRV1 及 TRV2 載體表現量，發現第三天時的 L1 位點為仍有 TRV1 載體大量表現，且在其他位點沒有被偵測到 (圖 3A)；而 TRV2 載體在接種後第 1 天即可在 L4 被偵測到，接種後第 3 天於 L4 持續大量表現，且有兩顆果實的 L2、L3、L4 仍可偵測到 TRV2 載體的表現 (圖 3B)。這些結果指出 VIGS 在接種第 1 天即可廣泛分布到果實中，且傳播到全果的效果可持續 3 天，且在 L1 位點表現的效果最顯著。

三、VIGS 對木瓜果實類胡蘿蔔素之影響

確認 TRV 載體成功在果實中傳播後，進一步利用 qPCR 檢測處理後第 3 天 L1 及 L4 之 *PDS* 基因之表現量，以瞭解 VIGS 對目標基因 *CpPDS* 的靜默的效果。*CpPDS* 基因在 VIGS 處理下的表現量皆顯著將低，L1 位點中約為對照組的 0.19-0.25 倍 (降低 70~81%)；且 VIGS 處理下的 L4 位點相對表現量約為 0.46 倍，未處理的 L4 位點相對表現量為 1.42，因此 L4 位點中 VIGS 處理能使該處基因表現量下降約 68% (圖 4)，顯示不論在 L1 或 L4 位點之 VIGS 處理皆能有效將低 *CpPDS* 基因表現量。*CpPDS* 為木瓜中類胡蘿蔔素生合成之基因，檢測結果顯示總類胡蘿蔔素的含量在 VIGS 處理下皆顯著降低，在 L1 及 L4 位點中約為對照組的 78% (圖 5)。顯示 VIGS 處理可顯著抑制木瓜果實的 *CpPDS* 基因之表現，並降低類胡蘿蔔素含量，且在催熟木瓜果實之 VIGS 效果可遍佈整顆果實。

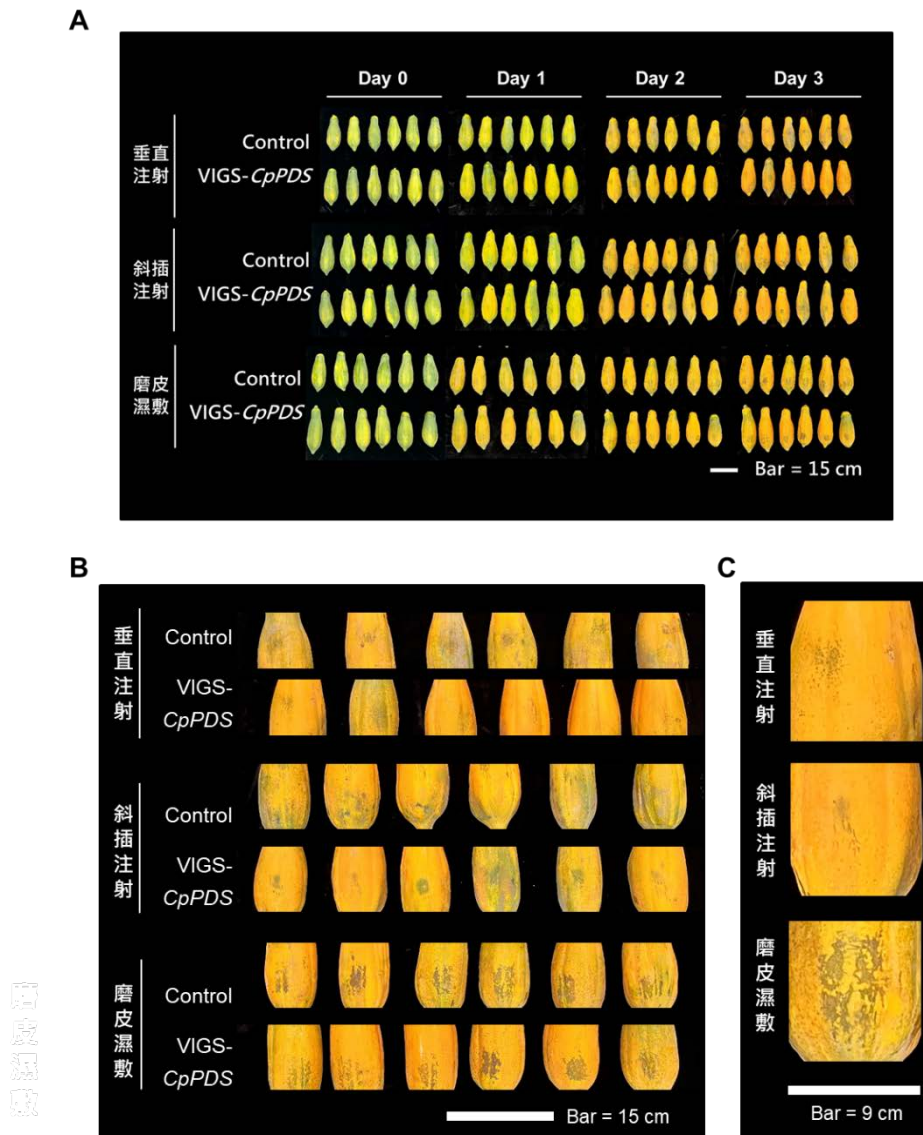


圖 1. 催熟後木瓜處理不同接種方式之 (A)外觀時序變化、(B)第 3 天顏色變化、(C)第 3 天傷口外觀。

Fig. 1. The appearance of ripening papaya after inoculation by 3 different methods (A) time course, (B) color change in day 3, (C) wounding outfit in day 3.

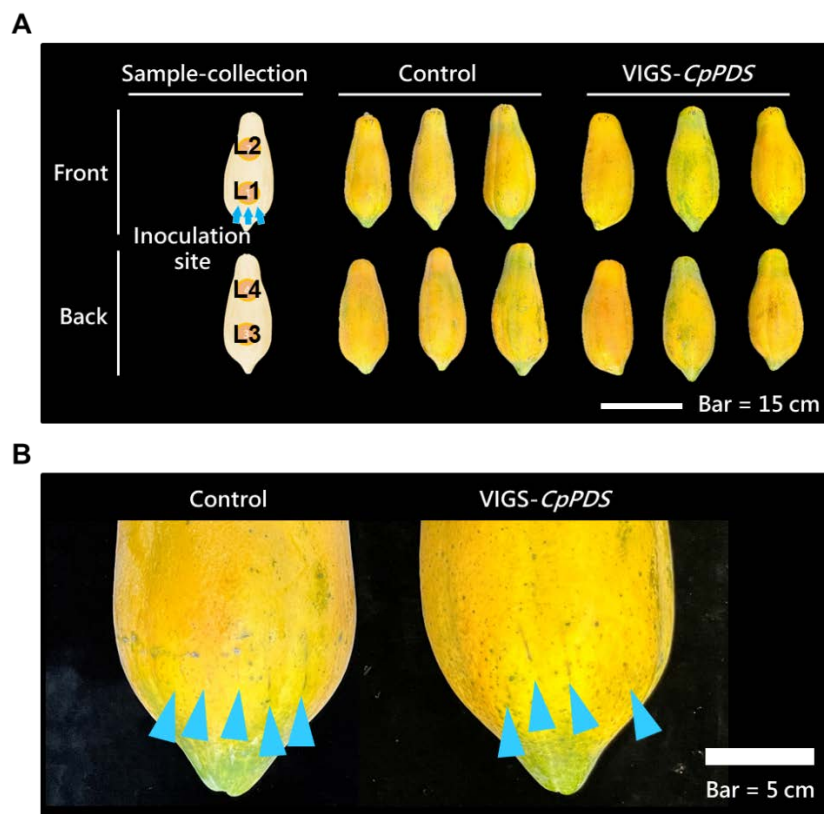


圖 2. 斜插注射接種第 3 天之外觀變化 (A)4 個位點以及 (B)L1 位點。比例尺為 15、5 公分。

Fig. 2. Inoculation by oblique-insertion method for 3 days of (A) 4 locations and (B) L1. Bar = 15 or 5 cm.

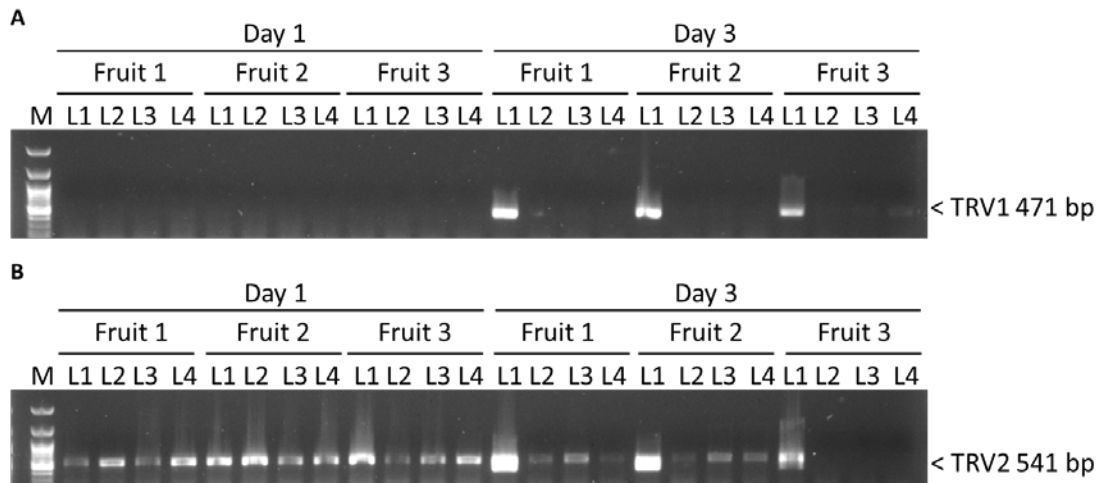


圖 3. VIGS 處理下 L1~L4 部位木瓜果實之載體表現情形。(A)TRV1 載體表現情形，目標擴增長度為 471 bp；(B)TRV2 載體表現量，目標擴增長度為 541 bp。Fruit 1/2/3 為每處理中 3 顆不同果實，樣品位點 L1 (Location 1)為正面接種部位為、L2 為正面接種上端、L3 為接種背面、L4 為背面上方距離接種部位最遠的位點。

Fig. 3. Vector expression of papaya fruit L1~L4 sites in VIGS treatment. (A) TRV1 expression, the amplified target was 471 bp. (B) TRV2 expression, the amplified target was 541 bp. Fruit 1/2/3 were three different fruits in each treatment. L1 (Location 1) was the inoculation site in fruit, L2 was the up-front site in fruit, L3 was the low-back site in fruit, and L4 was the up-back site in fruit which was the most distance from L1.

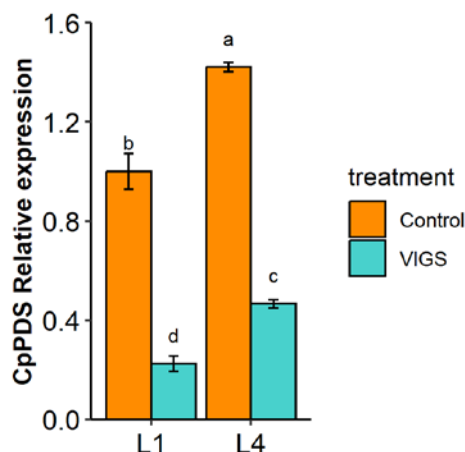


圖 4. Real-time PCR 檢測 *CpPDS* 基因在木瓜果實之表現量。統計計算以 one-way ANOVA 計算組之間的差異，事後檢定 (post-hoc test)採用 Tukey HSD，在 p-value < 0.05 為顯著，並以小寫英文字母標記。

Fig. 4. Relative *CpPDS* gene expression in L1 and L4 site of inoculation. L1 (Location 1) was the inoculation site in fruit, and L4 was the up-back site in fruit which was the most distance from L1. One-way ANOVA was applied for statistic with Tukey HSD post-hoc test. Significant was marked by lower-case letter when p-value < 0.05.

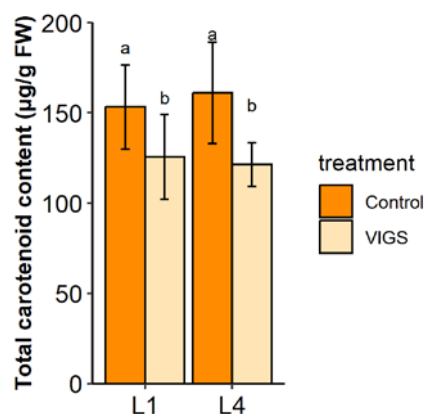


圖 5. 木瓜果實之總類胡蘿蔔素含量。統計計算以 one-way ANOVA 計算組之間的差異，事後檢定 (post-hoc test)採用 Tukey HSD，在 p-value < 0.05 為顯著，並以小寫英文字母標記。

Fig. 5. Total carotenoid content in L1 and L4 site of inoculation. L1 (Location 1) was the inoculation site in fruit, and L4 was the up-back site in fruit which was the most distance from L1. One-way ANOVA was applied for statistic with Tukey HSD post-hoc test. Significant was marked by lower-case letter when p-value < 0.05.

討 論

為了研究 *CpARF2* 轉錄因子對木瓜後熟的影響，學者曾使用針製造出多個 3 mm 深度之傷口，再以無針頭針筒將懸浮菌液注射進入木瓜果實，並且在注射後 3 天採樣 (Zhang *et al.*, 2020)。本研究中也嘗試使用相同的方式，設計以針頭直插注射、斜插注射、或磨皮濕敷等三種方式進行接種，實驗結果顯示斜插注射的方式接種後的效果最為顯著 (圖 1)。同時考量到若對表皮造成太大的傷口，容易使木瓜受到病毒病或在貯藏期間其他病害的影響，因此斜插注射是木瓜果實進行 VIGS 時較佳的接種方法。

木瓜小苗的研究中，學者構築了容易感染木瓜的木瓜畸葉嵌紋病毒載體 PLDMV (papaya leaf distortion mosaic virus)，在注射後 30 天觀察到明顯的新葉白化現象 (Tuo *et al.*, 2021)，且 VIGS 處理的 *CpPDS* 基因表現為對照組的 0.2-0.6 倍 (Tuo *et al.*, 2021)。而在本研究中以 TRV 病毒載體處理第 3 天檢測注射部位與遠端部位的目標基因表現量，同樣也可以觀察到注射部位 (L1) 的 *CpPDS* 基因相對表現量為對照組的 0.19-0.25 倍，且遠端部位 (L4) 的 *CpPDS* 基因相對表現量約為對照組的 0.3 倍 (圖 4)，顯示以 TRV 病毒載體處理木瓜果實 3 天後之感染力、傳播力、以及靜默目標基因之效果皆極為顯著，因此除了 PLDMV 之外，TRV 病毒也可以成功運用於木瓜果實之 VIGS，達到基因靜默的效果。

以往在果實進行 VIGS 相關研究時通常於掛果期進行注射，並在處理後一週以上的時間觀察基因靜默的效果。例如在奇異果的研究中，綠熟期階段注射樹上掛果果實，於第 8 天將果實採樣分析，驗證靜默 *AcUFGT3a* 基因能降低奇異果果肉的花青素生合成 (Liu *et al.*, 2018)。而荔枝的研究中在掛果期注射後 3 週採樣，觀察到靜默 *LcERF2* 表現能抑制荔枝果實脫落，並改變花梗生長和纖維細胞形態 (Yi *et al.*, 2021)。在辣椒的研究中在掛果期靜默 *NCED* 或 *ACO3* 基因，注射 1 週後觀察到後熟受到改變，且產生明顯的顏色差異 (Hou *et al.*, 2018)。掛果番茄於表皮靜默 *LeEIN2* 基因，5-6 週後觀察到後熟受到抑制且轉色不完全 (Fu *et al.*, 2005)。顯示以 VIGS 進行果實外觀影響之實驗，可能需要長的時間才能觀察到果實顏色及其它生理的改變。而本研究以離體並催熟之木瓜果實進行 VIGS 實驗，利用斜插注射進行 VIGS 後第 3 天即可測量到 *CpPDS* 基因表現及類胡蘿蔔素含量的顯著下降 (圖 4、圖 5)，且目標基因表現及色素含量在處理後第 3 天之變化皆達到統計上之顯著差異，顯示本研究建立之木瓜 VIGS 系統能夠成功運用於採收後快速後熟的果實。

參 考 文 獻

- Anandalakshmi, R., G. J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, A. C. Mallory, T. H. Smith, and V. B. Vance. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* 95: 13079-13084.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nat.* 431: 356-363.

- Becker, A. and M. Lange. 2010: VIGS—genomics goes functional. *Trends Plant Sci.* 15: 1-4.
- Bilgin, D. D., J. A. Zavala, J. Zhu, S. J. Clough, D. R. Ort, and E. H. DeLUCIA. 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 33: 1597-1613.
- Burch-Smith, T. M., M. Schiff, Y. Liu, and S. P. Dinesh-Kumar. 2006. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142: 21-27.
- Burch-Smith, T. M., J. C. Anderson, G. B. Martin, and S. P. Dinesh-Kumar. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 39: 734-746.
- Fu, D. Q., B. Z. Zhu, H. L. Zhu, W. B. Jiang, and Y. B. Luo. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* 43: 299-308.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Sci.* 286: 950-952.
- Hileman, L. C., S. Drea, G. de Martino, A. Litt, and V. F. Irish. 2005. Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J.* 44: 334-341.
- Hou, B.-Z., C.-L. Li, Y.-Y. Han, and Y.-Y. Shen. 2018. Characterization of the hot pepper (*Capsicum frutescens*) fruit ripening regulated by ethylene and ABA. *BMC Plant Biol.* 18: 1-12.
- Lichtenthaler, H. K. and C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 1: F4.3.1-F4.3.8.
- Liu, E. and J. E. Page. 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant methods* 4: 1-13.
- Liu, H., D. Fu, B. Zhu, H. Yan, X. Shen, J. Zuo, Y. Zhu, and Y. Luo. 2012. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). *J. Integr. Plant Biol.* 54: 422-429.
- Liu, Y., B. Zhou, Y. Qi, C. Liu, Z. Liu, and X. Ren. 2018. Biochemical and functional characterization of AcUFGT3a, a galactosyltransferase involved in anthocyanin biosynthesis in the red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Physiol. Plant.* 162: 409-426.
- Ratcliff, F., A. M. Martin-Hernandez, and D. C. Baulcombe. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25: 237-245.
- Senthil-Kumar, M., R. Hema, A. Anand, L. Kang, M. Udayakumar, and K. S. Mysore. 2007. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.* 176: 782-791.
- Shen, Y. H., F. Y. Yang, B. G. Lu, W. W. Zhao, T. Jiang, L. Feng, X. J. Chen, and R. Ming. 2019. Exploring the differential mechanisms of carotenoid biosynthesis in the yellow peel and red

- flesh of papaya. *BMC Genom.* 20: 1-11.
- Shi, G., M. Hao, B. Tian, G. Cao, F. Wei, and Z. Xie. 2021. A methodological advance of tobacco rattle virus-induced gene silencing for functional genomics in plants. *Front. Plant Sci.* 12: 671091.
- Tuo, D., P. Yan, G. Zhao, H. Cui, G. Zhu, Y. Liu, X. Yang, H. Wang, X. Li, and W. Shen, 2021. An efficient papaya leaf distortion mosaic potyvirus vector for virus-induced gene silencing in papaya. *Hortic. Res.* 8: 144.
- Voinnet, O., Y. M. Pinto, and D. C. Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* 96: 14147-14152.
- Wang, M., G. Wang, J. Ji, and J. Wang. 2009. The effect of *pds* gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Sci.* 177: 222-226.
- Waterhouse, P. M., H. W. Graham, and M. B. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* 95: 13959-13964.
- Yi, J. W., Y. Wang, X. S. Ma, J. Q. Zhang, M. L. Zhao, X. M. Huang, J. G. Li, G. B. Hu, and H. C. Wang. 2021. *LcERF2* modulates cell wall metabolism by directly targeting a UDP-glucose-4-epimerase gene to regulate pedicel development and fruit abscission of litchi. *Plant J.* 106: 801-816.
- Zhang, T., W. Li, R. Xie, L. Xu, Y. Zhou, H. Li, C. Yuan, X. Zheng, L. Xiao, and K. Liu. 2020. *CpARF2* and *CpEIL1* interact to mediate auxin–ethylene interaction and regulate fruit ripening in papaya. *Plant J.* 103: 1318-1337.

Establishment of VIGS system for Ripening Papaya Fruit

Chiu-Ling Yang¹⁾ Min-Chi Hsu²⁾ I-Chun Pan³⁾

Key words: Papaya 、 VIGS 、 PDS 、 Postharvest

Summery

Fruit ripening is an essential postharvest physiological mechanism affecting the fruit's commercial value. However, gene transformation in fruit trees is difficult and time-consuming, leading to the bottleneck in postharvest physiology research on gene function. Since virus-induced gene silencing (VIGS) system is a fast and effective method for silencing gene expression, it is a common tool for studying plant gene function. This study tested the transmission ability and efficacy of VIGS in papaya fruit, a crucial economic fruit in Taiwan, after ripening. Tobacco Rattle Virus (TRV) vector constructed with *CpPDS* gene fragment of papaya was applied to VIGS treatment of ripening fruit. After 3 days of inoculation by oblique injection, the expression level of *CpPDS* gene was successfully reduced by 70-81%, with total carotenoid content by about 21%. This study successfully established the optimal inoculation method for ripening papaya and clarified the VIGS reaction position, time, and effect of gene silencing. Developing the VIGS system in ripening papaya fruit will benefit the function research of ripening-related genes in fruit physiology and further contribute to studying the postharvest mechanism of other fruits.

1) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistance Researcher, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

3) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.

