Open Access

以 *SAD* 基因为靶标构建椰子愈伤组织 VIGS 体系的研究

杨彩票[1#]，尤丽莉[2]，李东栋[2]，郑育声[1*]

（1. 海南大学 生命健康学院，海南 海口 570228 中国；2. 海南大学 热带农林学院，海南 儋州 571737 中国）

摘　要：椰子（*Cocos nucifera* L.）遗传转化效率低是其功能基因组学研究的瓶颈。本研究以烟草脆裂病毒（Tobacco rattle virus, TRV）为载体，探索构建椰子愈伤组织病毒诱导的基因沉默（Virus-Induced Gene Silencing, VIGS）体系，并以椰油代谢中的关键基因—硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因（*CnSAD*）为靶标，系统优化了包括靶片段位点和长度、培养时间和缓冲液的 VIGS 关键参数。结果表明，采用 200 bp 靶向催化核心区与非跨膜螺旋区的特异性片段、培养 14 d，以及采用自主研发的椰子 VIGS 转化缓冲液（CVT）所建立的椰子愈伤组织 VIGS 体系可实现靶标基因 *CnSAD* 的表达量显著降低 40%（$P<0.01$）。*CnSAD* 基因沉默后油酸（C18:1）含量显著下降（$P<0.01$），硬脂酸（C18:0）含量显著上升（$P<0.05$）。本研究成功构建了基于愈伤组织的椰子 VIGS 技术体系，为椰子及其他木本植物功能基因鉴定提供了有效手段。

关键词：椰子；病毒诱导的基因沉默；愈伤组织；*CnSAD*；脂肪酸

中图分类号：S667.9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 − 7054(2026)06 − 1026 − 08

杨彩票, 尤丽莉, 李东栋, 等. 以 *SAD* 基因为靶标构建椰子愈伤组织 VIGS 体系的研究[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(6): 1026−1033.　DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.20250119　CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswxb.20250119

椰子（*Cocos nucifera* L.）隶属棕榈科椰子属，是多年生单子叶常绿乔木，素有“生命之树”之称[1]，也是热带地区最重要的经济作物之一[2]。近年来，随着功能基因组学的快速发展，病毒诱导的基因沉默（virus-induced gene silencing, VIGS）已成为解析植物基因功能的重要反向遗传学工具[3]。该技术是通过构建携带靶基因 cDNA 片段的重组病毒载体侵染植物，利用植物 RNA 沉默机制识别并降解同源靶基因 mRNA，从而特异性抑制目标基因表达[3−4]。VIGS 无需稳定转化即实现内源基因的瞬时沉默，实现快速功能鉴定，不仅被广泛应用于多种植物以揭示关键基因的生物学功能，也在作物改良与抗病育种中展现出巨大潜力[5]。例如，在杜鹃花（*Rhododendron simsii*）中建立了基于烟草脆裂病毒（tobacco rattle virus, TRV）的 VIGS 体系，成功沉默 RmPDS 基因，突破了该物种分子遗传技术缺乏的瓶颈[6]；并在中国枣（*Chinese jujube*）中也验证了 TRV-VIGS 的可行性，为木本植物功能基因组研究提供了有效工具[7]。

然而，在椰子研究领域，因外植体来源受限且易褐化、现有基因导入技术低效和筛选标记局限等瓶颈问题，导致遗传转化技术明显落后，严重制约了椰子重要性状形成的快速解析。结合新型病毒载体和离体再生体系改良，开发适用于椰子的高效基因沉默技术体系，已成为当前椰子功能基因组学研究的迫切需求。因而，本研究以愈伤组织为材料，探索建立椰子 VIGS 体系。

在前期研究中，本实验室诱导的椰子愈伤组织增殖迅速、遗传背景稳定，可显著缩短基因功能验证周期。根据以往研究报道，硬脂酰辅酶 A 去饱和酶（stearoyl-acyl carrier protein desaturase, CnSAD），是脂肪酸代谢中的一种关键酶，催化硬脂酸（C18:0）转化为油酸（C18:1），对油品有着重要的影响。由于该基因在椰子愈伤组织中高表达，沉默后的脂肪酸含量变化易于检测，因此，本研究选择 *CnSAD* 作为建立椰子 VIGS 体系的靶标基因。通

CC BY 4.0
收稿日期：2025−09−02　　**修回日期：**2025−12−27

基金项目：海南省自然科学基金高层次人才项目（323RC407）；国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目（U23A20220）；国家自然科学基金地区基金项目（32260064）

#第一作者：杨彩票（1999—）女，海南大学生命健康学院 2023 级硕士研究生。E-mail: 3341649622@qq.com

***通信作者：**郑育声（1977—）女，教授，博士导师。研究方向：植物代谢调控。E-mail: yusheng.zheng@hainanu.edu.cn

过系统优化 VIGS 的关键参数, 本研究成功构建了高效的椰子基因沉默体系, 为椰子基因功能验证提供了新的技术平台, 也为其他多年生木本植物高效 VIGS 体系的建立提供借鉴。

1　材料与方法

1.1　实验材料与培养条件　基于本实验室前期构建的椰子胚乳愈伤组织转录组数据[8], 筛选出在愈伤组织中高表达且与油脂代谢通路相关的基因, 并最终选定硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因(*CnSAD*)作为本研究 VIGS 体系的靶标基因。以海南高品种椰子(*Cocos nucifera* L.)成熟胚乳诱导的愈伤组织为实验材料, 由海南大学热带棕榈实验室提供。愈伤组织在光照培养箱(型号: 1603773S, 上海恒科学仪器有限公司)中培养, 培养条件为: 温度(28±1) ℃、相对湿度(65±5)%、光照强度为 400 ~ 700 nm、光周期 12 h 光照/12 h 黑暗。每 30 d 进行一次继代培养。所有 VIGS 侵染实验均在愈伤组织继代后 3 ~ 5 d、处于对数生长期进行。

1.1.1　片段扩增与载体构建　根据 *CnSAD* 基因序列(登录号: KF574390.1), 利用 SGN-VIGS 工具在其 PLN00179 结构域内设计了 5 个特异性沉默片段(Si*CnSAD* 1 ~ 5), 以椰子胚性愈伤组织 cDNA 为模板, 使用高保真酶 PCR 扩增各沉默片段。PCR 产物纯化后, 与经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切线性化的 pTRV2 载体, 使用无缝克隆试剂盒于 37 ℃ 连接 30 min。载体构建所用引物见表 1。

表 1　所用引物及其序列

Tab. 1　Primers and their sequences

引物名称 Primer	引物序列(5'—3') Sequence (5'—3')	片段长度/bp Fragment length	引物功能 Primer function
Si*CnSAD1*	F:GTGAGTAAGGTTACCGAATTCACTGAGAGAACGCTCTAAGGAGATCC R:GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCTCTGTCCTAGGATCCATTCCAGA	300	克隆 Cloning
Si*CnSAD2*	F:GTGAGTAAGGTTACCGAATTCAGAAGCTCTTCCTACTTATCAAACAATG R:GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCTTCCCATGGGAAATGAAGGTC	300	克隆 Cloning
Si*CnSAD3*	F:GTGAGTAAGGTTACCGAATTCGCCAAGGACTATGCTGACATACTTG R:GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCTCCCGGCCATAGATCCAAC	300	克隆 Cloning
Si*CnSAD4*	F:GTGAGTAAGGTTACCGAATTCGTGAGTAAGGTTACCGAATTC R:GGCCTCGAGACGCGTGAGCTGTTTCTCATCTGAGGCAATTATACCA	250	克隆 Cloning
Si*CnSAD5*	F:GTGAGTAAGGTTACCGAATTCGGAGAACAGACATGGAGACCTTCT R:GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCGCCTGGCAGTATTCCCATGG	200	克隆 Cloning
q*CnSAD*	F:ACAGAGAACAGCCCGTACCT R:ACTTCAGGTCCCCATGTTCC	120	荧光定量 Fluorescence quantification
Cnβ-actin	F:ATGGTGAAGGCTGGATTTGCTGG R:GCATCCTTTTGGCCCATCCC	150	荧光定量 Fluorescence quantification

1.1.2　重组质粒的转化与筛选　将连接产物加入 100 μL DH5α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 ℃ 热激 45 s, 冰浴 2 min 后加入 900 μL 无抗 LB 液体培养基, 37 ℃、200 r·min^{-1} 复苏 60 min。取 200 μL 菌液涂布于含 50 mg·L^{-1} Kan 的 LB 固体平板上, 37 ℃ 倒置培养过夜。

1.1.3　阳性克隆鉴定与农杆菌转化　随机挑取 8 ~ 10 个单克隆, 进行菌落 PCR 及双酶切鉴定, 并将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。将测序正确的重组质粒 pTRV2-*CnSAD* 通过冻融法转入农杆菌 EHA105 中, 用于后续侵染实验。

1.2　椰子愈伤组织缓冲液(CVT)的配制　本研究采用自主研发的椰子愈伤组织缓冲液 CVT 悬浮农杆菌。CVT 缓冲液配置如下: (1)微量元素母液的配制(1L): 0.083 g 碘化钾(KI)、0.93 g 硼酸(H_3BO_3)、2.23 g 四水合硫酸锰($MnSO_4·4H_2O$)、1.15 g 七水合硫酸锌($ZnSO_4·7H_2O$)、0.025 g 二水合钼酸钠($Na_2MoO_4·2H_2O$)、0.0375 g 五水合硫酸铜($CuSO_4·5H_2O$)及 0.025 g 六水合氯化钴($CoCl_2·$

$6H_2O$)。(2)铁盐母液配置(1L): 3.73 g 七水合硫酸亚铁($FeSO_4·7H_2O$)和 1.39 g 乙二胺四乙酸二钠(Na-EDTA)。有机微量元素母液配置(1L): 0.05 g 盐酸吡哆醇、0.01 g 盐酸硫胺素、0.05 g 烟酸、0.2 g 甘氨酸, 补充 6 mg 2-异戊烯腺嘌呤(2-IP)、8 mg 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、1 mg 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、0.1 g 肌醇及 40 g 蔗糖。所有成分溶解后定容为 1L, 经灭菌后放在 4 ℃ 冰箱, 每 2 个月更新备用。每次配制 CVT 时, 从各母液中分别量取 100 mL, 根据所使用的植物培养基进行调整使用。

1.3 表型观察与数据采集

1.3.1 褐化率统计 从侵染后第 3 d 起, 每 2 ~ 3 d 观察并记录愈伤组织变化。将颜色变为褐色或黑色的组织计为褐化。褐化率=(褐化组织块数 / 总处理组织块数)× 100%。每个处理设 3 个生物学重复。

1.3.2 荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析 于侵染后不同时间点(10、12、14、16 d)取样, 液氮速冻。使用植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录合成 cDNA。以椰子 β-肌动蛋白基因(Cocos nucifera beta-actin, *Cnβ-actin*)为内参基因, 使用 TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒在 QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪上进行检测。每个样品 3 个技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *CnSAD* 基因的相对表达量。本实验中, 空白对照为野生型愈伤组织, 阴性对照为空载载体侵染的愈伤组织。荧光定量所用引物详见表 1。

1.4 实验设计

为优化 VIGS 体系, 设计以下实验。1)缓冲液优化: 分别使用 CVT 和 MES 缓冲液制备农杆菌侵染液, 以空载体为对照, 比较其对褐化和沉默效率的影响; 2)片段优化: 比较 5 个不同靶向区域和长度(200、250、300 bp)的 *SiCnSAD* 片段的沉默效率; 3)培养时间优化: 在侵染后 10、12、14、16 d 取样, 分析沉默效率与褐化的动态变化。所有实验均设置至少 3 次独立的生物学重复, 数据以均值±标准差表示。

1.5 脂肪酸分析

从 5 个特异性片段中选取表达量显著下调的特异性片段, 分别采集空载体的阴性对照组(pTRV2)及基因沉默型(pTRV2-*SiCnSAD*5)椰子愈伤组织各 1 g, 于液氮中快速研磨至粉末状。以体积比 2:1 氯仿甲醇溶液为提取剂, 提取样品的总油脂。接着加入按体积比 1:40 配制浓硫酸甲醇溶液混匀, 再向该溶液中加入 C17:0 烷酸标准品, 加入量为每 2 mL 浓硫酸甲醇溶液加入 10 μL 的 C17:0 烷酸标准品。水浴 80 ℃ 将样品甲酯化, 甲酯化样品使用氮吹仪吹干后, 溶解样品于正己烷中。通过 Hewlett-Packard Ultra GC 仪器和 HP-FFAP 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm 厚)分离脂肪酸甲酯并进行 GC 分析。根据不同脂肪酸出峰时间以及峰面积的不同, 通过内标法计算得出脂肪酸甲酯含量与各类脂肪酸在总脂肪酸中的占比。

1.6 数据分析

所有数据利用 SPSS v26.0 软件进行显著性分析。其中 2 组数据间的差异性检验方法为“独立样本 *t* 检验”, 多组数据间的差异性检验方法为“多重比较检验”。所有图*: $P<0.05$ 视为差异有统计学意义; **: $P<0.01$ 视为差异有高度统计学意义; ***: $P<0.001$ 视为差异有极其显著的统计学意义。

2 结果与分析

2.1 靶标基因 *CnSAD* 在不同组织中的表达分析

qRT-PCR 检测结果表明, *CnSAD* 基因在椰子愈伤组织中的表达量最高, 在花中次之, 在叶片中表达量最低, 表现出明显的表达差异(图 1)。鉴于该基因在脂肪酸代谢途径中的关键作用及其在愈伤组织中的高表达水平, 本研究选择 *CnSAD* 作为建立 VIGS 体系的靶标基因。

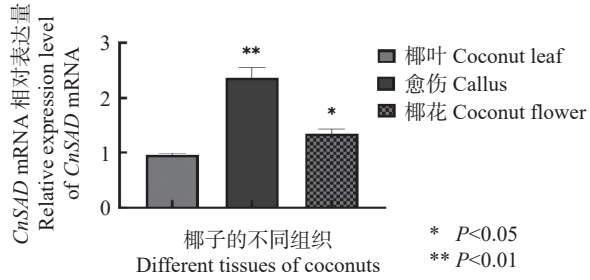

图 1 *CnSAD* 基因在椰子不同组织中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *CnSAD* gene in different tissues of coconut

2.2 沉默片段设计与长度优化

为探究最佳沉默片段, 构建了 5 个靶向 *CnSAD* 不同功能区域的 pTRV2 重组载体, 其 PCR 扩增及双酶切线性化结果如(图 2-A—F)所示。首先比较了长度均为 300 bp 但靶向区域不同的 3 个片段(Si*CnSAD*1-3), 结果显示, 同时靶向催化核心区与非跨膜螺旋区的

Si*CnSAD*3 沉默效率最高(32%, P<0.01)(图 2-G)。在此基础上, 进一步比较了靶向同一区域但长度不同的片段(Si*CnSAD*3: 300 bp, Si*CnSAD*4: 250 bp, Si*CnSAD*5: 200 bp)。qRT-PCR 分析表明, 200 bp 的 Si*CnSAD*5 片段沉默效果最佳, 使 *CnSAD* 表达量降低 43%(P<0.001)(图 2-H)。因此, 靶向催化核心区与非跨膜螺旋区、长度为 200 bp 的片段是椰子愈伤组织 VIGS 体系的最优选择。

分析了侵染后不同培养时间(10、12、14、16 d)对沉默效率和愈伤组织状态的影响。结果表明, 随着培养时间延长, 所有处理组的愈伤组织褐化程度均逐渐加重, 至 16 d 时出现严重褐化甚至坏死(图 3-A)。*CnSAD* 的沉默效率在侵染后随时间推移而提高, 于 14 d 时达到峰值(30% ~ 40%), 随后在 16 d 时略有下降(图 3-B—F)。综合褐化程度与沉默效率, 确定 14 d 为最佳取样和分析时间点。

2.3　不同缓冲液对 VIGS 体系的影响　为评估不同缓冲液对 VIGS 体系的影响, 采用沉默效率最佳的 *SiCnSAD5* 片段, 比较了 CVT 与常规 MES 缓冲液的效果。结果显示, 侵染后 14 d, MES 处理组愈伤组织出现严重褐化(图 4-A), 而 CVT 处理组褐化程度明显减轻(图 4-B)。CVT 组的褐化率显著低于 MES 组(P<0.05)(图 4-C)。同时, qRT-PCR 分析表明, CVT 组中 *CnSAD* 基因的表达下调幅度显著大于 MES 组(P<0.05), 沉默效率更高(图 4-D)。这表明 CVT 缓冲液更适于椰子愈伤组织的 VIGS 转化。

为验证 VIGS 体系的生物学效应, 分析了 *SiCnSAD5* 片段沉默后椰子愈伤组织的脂肪酸组成。与空载体对照组相比, *CnSAD* 沉默导致愈伤组织总油脂含量显著增加(图 5-A)。更重要的是, 脂肪酸组分发生显著改变, 即硬脂酸(C18:0)含量极显著上升(P<0.01), 而其去饱和产物油酸(C18:1)含量则极显著下降(P<0.01)(图5-B),这与*CnSAD*酶的生物学功能完全吻合。此外, 棕榈酸(C16:0)和花生酸(C20:0)含量也显著增加, 而多不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)含量显著降低(P<0.001), 表明 *CnSAD* 沉默对脂肪酸代谢网络产生了广泛影响。

3　讨　论

与传统 VIGS 体系主要应用于模式植物或可进行整株感染的双子叶植物不同, 本研究首次将 VIGS 技术拓展至椰子愈伤组织。传统 VIGS 研究多依赖叶片等分化组织, 利用系统性病毒在植株体内扩散以实现基因沉默, 而椰子作为单子叶木

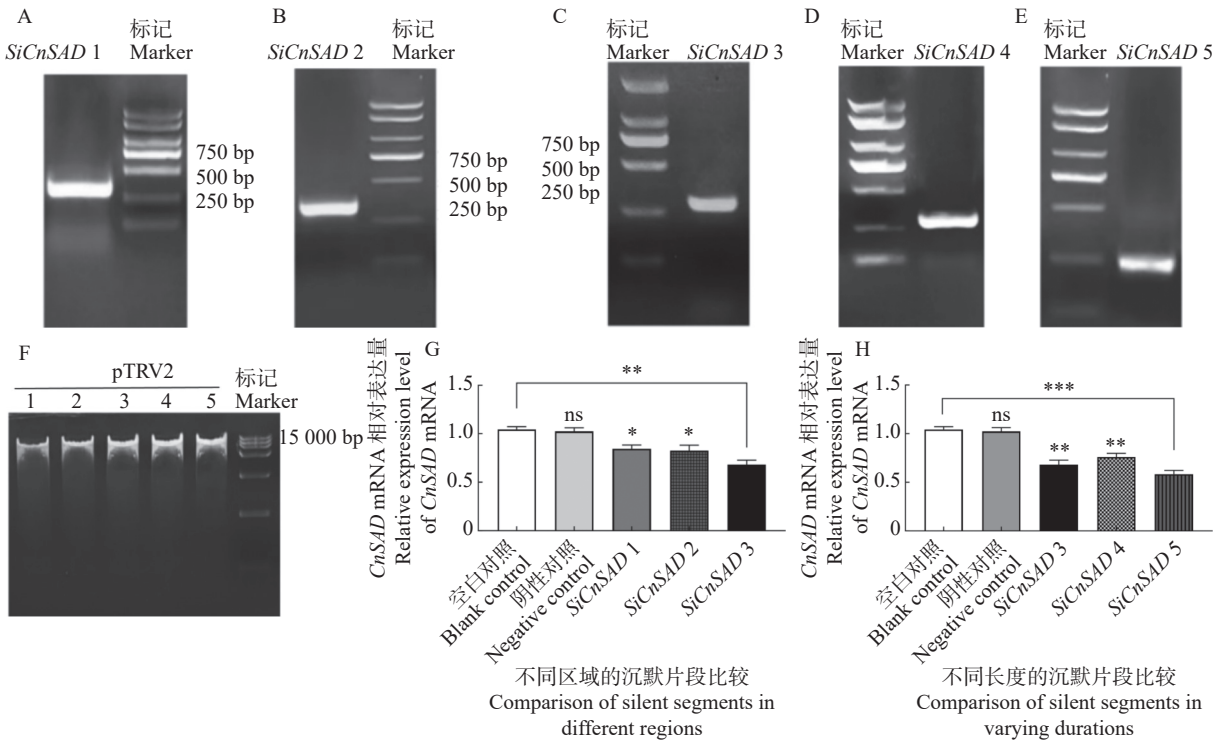

图 2　不同沉默片段对 *CnSAD* 基因沉默效率的影响

Fig. 2　Effect of different silencing fragments on the silencing efficiency of the *CnSAD* gene

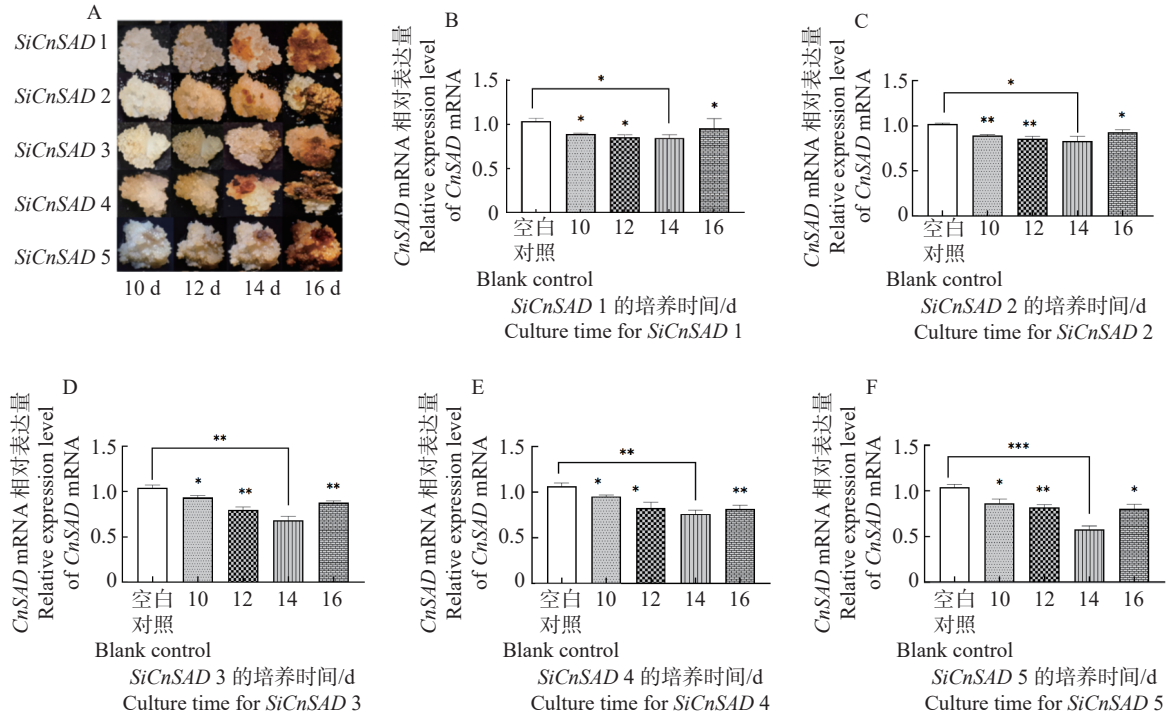

图 3　培养时间对转基因椰子愈伤组织褐化及 *CnSAD* 沉默效率的影响

Fig. 3　Effects of culture duration on browning and *CnSAD* silencing efficiency in transgenic coconut callus.

本植物，其组织结构复杂、生命周期长，且难以获得稳定的转基因植株，导致传统 VIGS 策略难以直接应用[8−11]。在构建沉默体系时，农杆菌菌株的选择至关重要。本研究选用 EHA105菌株进行侵染，主要基于其在单子叶植物愈伤组织中具有更强的 T-DNA 转移能力和对植物激素的耐受性，是实现椰子愈伤组织这类难转化材料高效基因沉默的关键因素之一[12−13]。选择椰子愈伤组织作为受体，本研究不仅规避了整株感染的限制，还优化了菌株选择策略，使基因沉默可在体外组织培养体系中稳定实现，显著提高了椰子功能基因研究的可行性和效率。

此外，本研究以 *SAD* 基因为靶标，该基因在脂肪酸不饱和化过程中具有明确表型关联，为 VIGS 效率评估提供了可操作的生理指标。这种结合靶基因特征与愈伤组织体系的创新策略，不仅突破

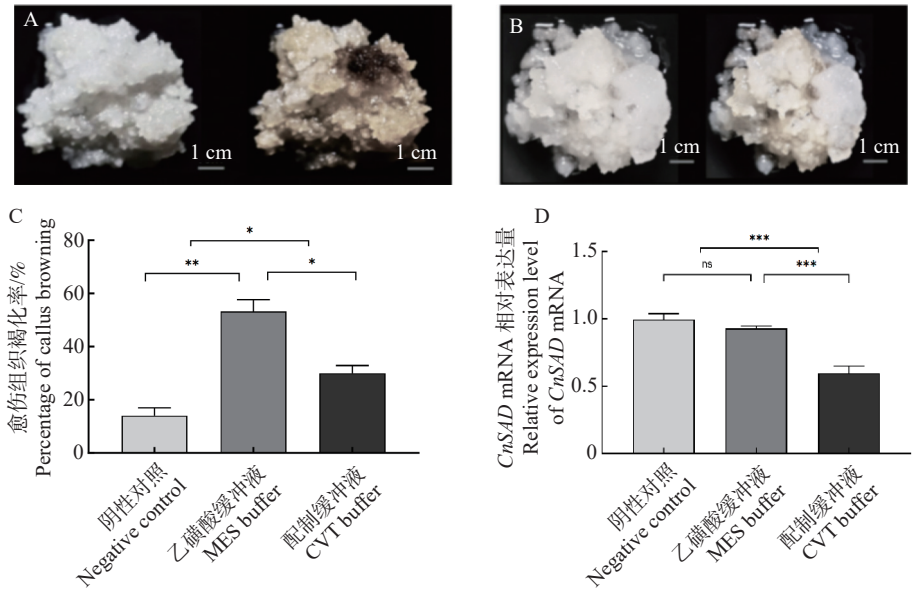

图 4　不同处理组对椰子愈伤组织褐化率及 *CnSAD* 相对表达量的影响

Fig. 4　Effects of different treatments on the browning rate and *CnSAD* relative expression level in coconut callus

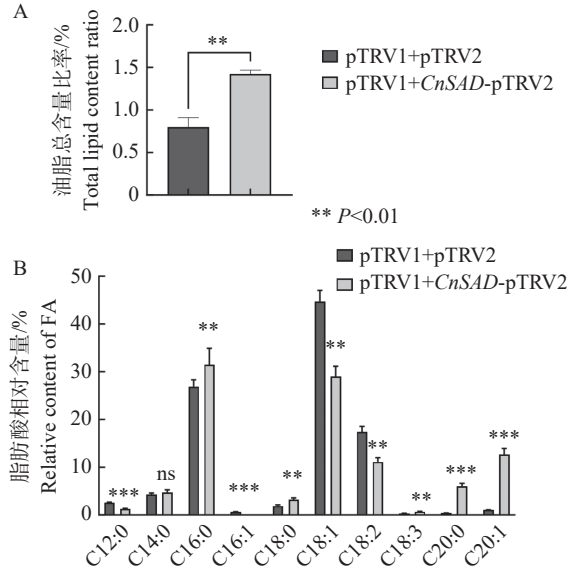

图 5　*CnSAD* 基因沉默对椰子愈伤组织总油脂和脂肪酸含量的影响

Fig. 5　Effects of *CnSAD* silencing on total lipid content and fatty acid composition in coconut callus.

了椰子基因功能验证的技术瓶颈，也为其他难以转化的木本单子叶植物提供了参考。

相比传统的转基因或基因编辑策略，基于 TRV 的 VIGS 体系在椰子愈伤组织中的应用具有显著优势。首先，该体系无需获得稳定的转化植株，显著缩短了功能验证周期，适用于椰子这种生命周期长、转化效率低的物种[14]。其次，在愈伤组织中开展基因沉默研究不仅便于病毒载体的高效侵染，还可结合体外培养体系实现快速筛选与定量分析，避免整株植株资源和空间的巨大消耗[15−16]。这一策略为椰子基因功能研究，尤其是参与重要代谢途径和胁迫响应的基因，提供了高效可行的技术平台。进一步来看，建立愈伤组织 VIGS 体系，不仅加速了椰子功能基因组学的研究进展，还为脂肪酸代谢、油脂品质改良及抗逆性的提升提供理论和技术支撑。这对于提高椰子油产业竞争力、推动新品种培育具有重要的应用前景，同时也为其他热带木本油料作物的分子改良探索提供借鉴。

在 VIGS 体系中，传统上使用 MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)缓冲液来稳定培养基的 pH[17]。尽管 MES 缓冲液被广泛用于农杆菌介导的植物转化体系，但其在单子叶植物(如油棕和椰子)中的适用性存在局限性[18]。因此，需根据具体的植物种类和实验条件优化缓冲液种类。本研究针对椰子愈伤组织的生理特性，优化出一种新型的椰子 VIGS 转化缓冲液(CVT)，包含了椰子生长必需的微量元素(如 Mn^{2+}、Zn^{2+})和植物激素(如 2,4-D、6-BA)。采用这种自主研发的 CVT 缓冲液培养 VIGS 转化后的椰子愈伤组织，愈伤组织的褐化率显著降低(P<0.05)，靶基因的沉默效率也提高至 40%。这些说明，CVT 缓冲液能有效地促进椰子 VIGS 体系的建立。这是椰子 VIGS 体系构建中重要的改良策略。其内在的原因可能是椰子 CVT 缓冲液中添加了 2-异戊烯腺嘌呤(2-IP)，2-IP 能增强了椰子愈伤组织细胞的活力，这一结果与油棕研究中，愈伤组织对缓冲液成分敏感的结论相一致[19−20]。

在靶向区域的选择上，有报道基因的保守功能域(如催化核心区、结构域、靶向 ORF 区等)是设计高效沉默片段的关键[21−22]。本研究以 *CnSAD* 基因为靶标。序列分析表明，椰子中存在 *SAD* 同源基因。因此，针对保守域设计的 VIGS 片段在高效沉默靶基因的同时，可能介导对同源转录本的共沉默，这或是实验中出现广泛脂肪酸代谢变化的原因之一。在靶序列设计长度层面，本研究系统比较了不同长度片段的沉默效率，发现长度为 200 bp 的 *SiCnSAD5* 片段，其沉默效果最佳，这与槟榔的研究中长度为 341 bp 的片段沉默效率最高，略有不同，提示可能是由于不同植物对片段长度的敏感性存在差异[23]。这暗示单子叶植物中可能存在“最优长度区间”(200 ~ 300 bp)，反映单子叶植物对片段长度的独特响应。

此外，愈伤组织的培养时间也是一个重要的技术参数。在本研究中，综合椰子愈伤组织褐化情况和 *CnSAD* 的沉默效果，14 d 是最佳时间，沉默效率达 40%。这与槟榔(*Areca catechu* L.)最佳时间(10 ~ 12 d)[23] 和油棕(*Elaeis guineensis* Jacq)最佳时间(12 ~ 14 d)[18] 在植物 VIGS 体系中的培养时间呈现一致性，暗示植物细胞分裂周期可能是影响 VIGS 体系构建的重要因素。利用本研究所创建的椰子 VIGS 体系，有效地实现了椰子愈伤组织中 *CnSAD* 基因的沉默，并证实了沉默后的椰子愈伤组织中油酸(C18:1)含量显著降低，而硬脂酸(C18:0)含量显著增加，这与硬脂酰-ACP 去饱和酶的功能相吻合。充分验证了椰子愈伤组织 VIGS 沉默体系的有效性，为今后椰子功能基因的验证提供了重要的实验平台。

尽管本研究构建的 TRV 介导椰子愈伤组织 VIGS 体系在功能基因研究中展现出明显优势，但仍存在一定局限性。首先，愈伤组织与整株植株在代谢状态和基因表达谱上存在差异，沉默效应能否在整株水平完全重现仍需进一步验证。其次，VIGS 沉默通常为暂时性且沉默效率受病毒载体稳定性和宿主反应影响，可能导致部分基因难以获得稳定沉默。此外，椰子愈伤组织的诱导与维持对培养条件敏感，限制了该体系在大规模应用中的通用性。未来研究可通过优化病毒载体结构以提高宿主适应性，结合高通量检测手段精确评估沉默效率，并探索将 VIGS 与愈伤组织再生体系整合，实现从体外功能验证到整株植株性状改良的过渡。进一步地，开发更稳定、广谱的单子叶病毒载体，或将 VIGS 与 CRISPR 等基因编辑技术结合，将有望为椰子及其他难以转化的木本作物建立高效、可持续的分子改良途径。

4 结 论

本研究成功建立了以 TRV 介导椰子愈伤组织的高效 VIGS 技术体系。体系优化的关键参数包括：使用自主研发的 CVT 缓冲液作为农杆菌悬浮介质，选取 200 bp 靶向 *CnSAD* 基因催化核心区与非跨膜螺旋区的特异性片段（*SiCnSAD5*），并在侵染后培养 14 d 进行检测。该体系可实现椰子愈伤组织中靶基因的高效沉默（效率达 40%），其建立的体系亦可为其他难转化木本植物 VIGS 体系的构建提供参考。

参考文献：

[1] Patil U, Benjakul S. Coconut milk and coconut oil: their manufacture associated with protein functionality[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(8): 2019−2027. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14223

[2] Kishore N, Verma A K. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.): a natural gift to humans for dental ministration[M]// Chauhan D N, Singh P R, Shah K, et al. Natural oral care in dental therapy. Hoboken: Wiley, 2020. https://doi.org/10.1002/9781119618973.ch17

[3] 黄雯婧, 任思潮, 林俐, 等. RNA 干扰在植物功能基因组学和遗传改良中的应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2025, 41(9): 1−21. https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0645

[4] Wang C Q, Ma Z M, Zhou J H, et al. A simple and effective VIGS system facilitates the control of citrus canker by silencing *CsLOB1*[J]. Phytopathology Research, 2024, 6 (1): 12. https://doi.org/10.1186/s42483-024-00234-z

[5] Bomzan D P, Kumar K, Kumar S R, et al. Virus-induced gene silencing for functional genomics of specialized metabolism in medicinal plants[M]//Mysore K S, Senthil-Kumar M. Plant gene silencing: methods and protocols. New York: Humana, 2022: 147−63. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1875-2_10

[6] Xu Y Y, Cui Y M, Chen H Y, et al. Development and application of the TRV-induced gene-silencing system in different rhododendron species[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2024, 157: 61. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02782-w

[7] Dinesh-Kumar S P, Anandalakshmi R, Marathe R, et al. Virus-induced gene silencing[M]//Grotewold E. Plant functional genomics. Humana Totowa: Humana Press, 2003. https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:287

[8] 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. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-020542

[9] Wang Y F, Huang N, Ye N, et al. An efficient virus-induced gene silencing system for functional genomics research in walnut (*Juglans regia* L.) fruits[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 661633. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.661633

[10] Maslini J A, Intan N H A H. Micropropagation of coconut (*Cocos nucifera* Linn *var. pandan*) through somatic embryogenesis technique[J]. Food Research, 2024, 8(S7): 28−35. https://doi.org/10.26656/fr.2017.8(S7).5

[11] 田焕焕, 覃瑞, 刘虹, 等. 病毒诱导基因沉默 (VIGS) 在禾本科植物中的研究进展[J]. 植物学研究, 2014, 3 (3): 91−104. https://doi.org/10.12677/BR.2014.33014

[12] 薄路花 曹越平.不同大豆品种对农杆菌 EHA105 和 GV3101 敏感性及共培养条件的优化[J].上海交通大学学报：农业科学版, 2015, 33(1):6. https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1671-9964.2015.01.005

[13] 黄仁良,沈显华,熊宏亮,等.农杆菌介导的籼型水稻恢复系 R752 成熟胚转基因技术体系的优化[J].江西农业学报, 2015, v.27(012):1-6. https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-8581.2015.12.001

[14] Khan F S, Li Z Y, Shi P, et al. Transcriptional regulations and hormonal signaling during somatic embryogenesis in the coconut tree: an insight[J]. Forests, 2023, 14(9): 1800. https://doi.org/10.3390/f14091800

[15] Arumugam T, Hatta M A M. Improving coconut using modern breeding technologies: challenges and opportunities[J]. Plants, 2022, 11(24): 3414. https://doi.org/10.3390/plants11243414

[16] 高鹏飞, 席飞虎, 张泽宇, 等. 植物 VIGS 技术及其在林业科学中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37 (5):141−153.https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1452

[17] Kagenishi T, Yokawa K, Baluška F. MES buffer affects *Arabidopsis* root apex zonation and root growth by suppressing superoxide generation in root apex[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 79. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00079
[18] 李萌晗, 王威, 邹积鑫, 等. 油棕病毒诱导的基因沉默体系的建立及优化[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 259−264. https://doi.org/10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.032
[19] Zhu Y X, Ouyang W J, Li Y, et al. The effects of 2ip and 2, 4-D on rice calli differentiation[J]. Plant Growth Regulation, 1996, 19(1): 19−24. https://doi.org/10.1007/BF00024398
[20] 苗春波,万志刚,孙丙耀.2,4-D 和 6-BA 对籼稻成熟胚愈伤组织诱导和植株再生的影响[J].安徽农业科学,2009,37(27):12927-12929. https://doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2009.27.077
[21] Munir A, Azam S, Aslam S, et al. Computational design of small interfering RNAs and small hairpin RNAs to silence mutated P53 gene expressions[J]. Informatics in Medicine Unlocked, 2018, 12: 1−5. https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.004
[22] Malakondaiah S, Julius A, Ponnambalam D, et al. Gene silencing by RNA interference: a review[J]. Genome Instability & Disease, 2024, 5(5): 225−241. https://doi.org/10.1007/s42764-024-00135-7
[23] Yang X Q, Liu Z J, Li Y, et al. Construction and optimization of the TRV-mediated VIGS system in *Areca catechu* embryoids[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 338: 113621. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113621

Establishment of a VIGS system in coconut callus via targeting the *SAD* gene

Yang Caipiao[1#], You Lili[2], Li Dongdong[2], Zheng Yusheng[1*]
(1. College of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Coconut (*Cocos nucifera* L.) is a perennial woody plant, and the low efficiency of genetic transformation is a bottleneck constraining its functional genomics research. The Tobacco rattle virus (TRV) was used as a vector to explore the construction of a virus-induced gene silencing (VIGS) system in coconut callus. Taking *CnSAD* (stearoyl-CoA desaturase gene), a key gene involved in coconut oil metabolism, as the target, the critical VIGS parameters, including the target fragment site and length, culture duration and buffer type, were systematically optimized. The results indicate that the established coconut callus VIGS system, utilizing a 200 bp specific fragment targeting the catalytic core domain and non-transmembrane helical regions, along with a 14-day culture period and the self-developed Coconut VIGS Transformation Buffer (CVT), achieved a significant 40% reduction in the expression level of the target gene *CnSAD* ($P < 0.01$). After *CnSAD* gene silencing, the oleic acid (C18:1) content decreased significantly ($P < 0.01$), while the stearic acid (C18:0) content increased significantly ($P < 0.05$). A callus-based VIGS technical system was successfully constructed for coconut, and it provides an effective tool for functional gene identification in coconut and other woody plants.

Keywords: coconut; VIGS; callus; *CnSAD*; fatty acids

(责任编辑:邹游兴)