

引用格式:

刘芬, 罗婕, 滕慧, 王育捷, 赵燕, 张学文. 辣椒和烟草瞬时转化中3种报告基因系统表型的比较分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 63–68.

LIU F, LUO J, TENG H, WANG Y J, ZHAO Y, ZHANG X W. Comparison analysis of transient expression phenotypes for three reporter gene systems in pepper and tobacco[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(6): 63–68.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 辣椒和烟草瞬时转化中3种报告基因系统表型的比较分析

刘芬, 罗婕, 滕慧, 王育捷, 赵燕, 张学文\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 选取反义*PDS*(*antiPDS*)、RUBY报告基因系统以及病毒诱导的基因沉默(VIGS)介导的*PDS*基因沉默等3种报告基因系统, 构建了由CaMV 35S启动子调控的pBI121-*antiPDS*、pTRV2-*PDS*和1300flag-RUBY植物转化载体, 采用根癌农杆菌侵染法将3种报告基因系统分别对烟草和辣椒进行瞬时转化, 通过分析*antiPDS*干扰、VIGS及RUBY瞬时表达的表型, 研究了3种报告基因系统在烟草和辣椒中的表达效果。3种报告基因系统在烟草叶片中进行瞬时转化验证后将其转入辣椒叶片中。试验结果表明: 3种报告基因系统在烟草和辣椒叶片中瞬时转化后均表现出比较明显的表型, 其中VIGS和*antiPDS*均能有效沉默*PDS*, 导致叶片出现白化斑块现象, 且前者展现出更强的广泛性和侵染性, 符合病毒介导基因沉默的特征; 相较之下, *antiPDS*的抑制功能限制于转化部位的局部区域, 缺乏侵染性; RUBY瞬时转化后在绿色叶片上形成红色斑块, 但也局限在农杆菌作用的区域。在烟草和辣椒3种报告基因系统的瞬时转化中, VIGS沉默的表型最明显, 但这种白化表型会抑制叶片光合功能, 影响转化材料的后续生长与繁殖, 仅适用于瞬时转化的标记; RUBY系统作为功能获得型报告基因, 其表达不影响辣椒后续的生长与繁殖, 推测RUBY系统更适合作为辣椒稳定遗传转化的指示基因。

**关键词:** 辣椒; 烟草; 报告基因; 瞬时表达

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)06-0063-06

## Comparison analysis of transient expression phenotypes for three reporter gene systems in pepper and tobacco

LIU Fen, LUO Jie, TENG Hui, WANG Yujie, ZHAO Yan, ZHANG Xuewen\*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** Plant transformation vectors pBI121-*antiPDS*, pTRV2-*PDS*, and 1300flag-Ruby, each driven by the 35S promoter were constructed using antisense *PDS*(*antiPDS*), RUBY, and virus-induced gene silencing (VIGS)-mediated *PDS* silencing as reporter gene systems, respectively. Transient transformation of these vectors in tobacco and pepper was performed via *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. The expression effects of the three reporter gene systems were evaluated based on the phenotypic outcomes resulted from transient expressions of *antiPDS* interference, VIGS, and RUBY. All three reporter genes systems were first validated in tobacco leaves and then introduced into pepper leaves. The results showed that each system produced discernible phenotypic changes in both species. Both VIGS and *antiPDS* effectively silenced *PDS*, leading to localized bleaching patches in infiltrated leaves. VIGS induced more extensive and systemic silencing, consistent with its viral propagation nature, whereas *antiPDS* caused only localized suppression without spreading. Transient expression of RUBY produced red pigmentation, which confined to the infiltration zones. Among the three reporter systems tested, VIGS-mediated silencing produced the most visually striking phenotype in both

收稿日期: 2025-02-17

修回日期: 2025-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(U21A20230)

作者简介: 刘芬(2000—), 女, 湖南涟源人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传转化研究, 1404285447@qq.com; \*通信作者, 张学文, 博士, 教授, 主要从事细胞生物学研究, xwzhang@hunau.edu.cn

tobacco and pepper. However, the bleaching caused by *PDS* silencing impaired photosynthetic function, which consequently hindered the subsequent growth and regeneration of transformed tissues, thereby limiting its use to transient assays. In contrast, the RUBY system acts as a gain-of-function reporter without adverse effects on plant development, suggesting it is a more suitable visual marker for applications requiring stable genetic transformation in pepper.

**Keywords:** pepper; tobacco; reporter genes; transient expression

农杆菌介导的遗传转化有稳定型转化(stable genetic transformation)和瞬时转化(transient transformation)2种方式。稳定型遗传转化旨在获得能够代际传递的转基因个体,而瞬时转化则将外源基因转入受体植物的部分细胞或组织中,以实现基因表达并获得局部表型<sup>[1]</sup>。相较于稳定转化,瞬时转化无需建立转基因世代,其基因表达局限于特定细胞和组织,具有更高的便捷性。因此,瞬时转化已被广泛应用于植物转基因表达分析及调控元件功能研究<sup>[2]</sup>。

病毒诱导的基因沉默(VIGS)是一种基于瞬时转化的基因功能研究技术,通过根癌农杆菌转化植物细胞,将2类质粒转入植物细胞后,利用病毒RNA复制合成大量干扰RNA(RNAi),实现靶基因敲低,并通过观察植物表型或生理特征的变化以判断基因功能<sup>[3]</sup>。RHEE等<sup>[4]</sup>利用基于黄瓜果实斑驳花叶病毒(CFMMV)的VIGS载体pCF93,在西瓜中成功沉默了8个雄性不育相关候选基因,导致雄蕊异常并形成无花粉的不育雄花。

在稳定型转化或瞬时转化中,转化载体构建时通常将报告基因(reporter gene)与目标基因连锁或平行进行转化,以实现转化效率的可视化监测<sup>[5]</sup>。传统报告基因包括 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS)<sup>[6]</sup>、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)<sup>[7]</sup>、红色荧光蛋白(RFP)<sup>[8]</sup>及其他荧光蛋白衍生物。近年来,易于直接观察的报告基因逐步应用于植物瞬时转化研究,包括参与类胡萝卜素生物合成的关键基因八氢番茄红素去饱和酶基因(*PDS*)<sup>[9]</sup>及由4个基因协调控制的甜菜碱合成系统(RUBY)。*PDS*的抑制会影响植物类胡萝卜素的合成,导致植物表现出白化现象<sup>[10-12]</sup>。这一特征使其成为多种植物转化的指示标记<sup>[13-14]</sup>。在茄科植物中*PDS*作为报告基因表现出良好的应用效果,在亲缘关系相近的物种间也能发挥作用。NAING等<sup>[15]</sup>证实,辣椒*PDS*基因能有效沉默番茄果实中内源性*PDS*基因。SRINIVASAN等<sup>[16]</sup>通过RNA干扰和反义技术下调*PDS*基因的表达,均导致光系统II功能发

生障碍。

RUBY系统是一种新型植物转化报告基因系统,能将细胞中酪氨酸转化为甜菜碱,使细胞或组织呈现红色素沉着<sup>[17]</sup>。甜菜碱是一种重要的天然色素,主要存在于甜菜根、火龙果、多叶苋菜和瑞士甜菜等多种植物中<sup>[18]</sup>。RUBY系统在异源植物中表达时,可在组织内使甜菜红素高效积累,实现转化事件的无损、直观可视化<sup>[19]</sup>。基于这一特性,RUBY系统已被拓展应用于作物育种的关键环节。WANG等<sup>[20]</sup>研究表明,利用RUBY系统可实现玉米和番茄单倍体的高效、精准鉴定,为双单倍体育种提供了便捷工具。CHEN等<sup>[21]</sup>将该RUBY系统与基因编辑技术结合,在大豆中建立了通过子叶颜色直接筛选不含选择标记的基因编辑植株的视觉识别体系,显著提高了筛选效率。

随着辣椒(*Capsicum* spp.)功能基因组学研究的深入<sup>[22-24]</sup>,建立稳定、高效的遗传转化体系,并筛选适用于辣椒的标记基因与报告基因,对于推动其基因功能解析与分子育种具有重要意义<sup>[25]</sup>。为此,笔者选取反义*PDS*(*antiPDS*)、RUBY系统以及VIGS介导的*PDS*基因沉默,构建了pBI121-*antiPDS*反义沉默载体,并利用1300flag-RUBY报告基因和pTRV2-*PDS*重组载体(VIGS沉默),分析3种报告基因载体系统在辣椒遗传转化中作为有效可视化工具的适用性,以期对辣椒的基因功能研究与遗传改良提供更便捷、高效的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

农杆菌GV3101菌株、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)菌种、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子、pBI121载体均为湖南农业大学基因工程与细胞生物学实验室保存材料,辣椒ST-8品系、VIGS体系中pTRV2-*PDS*载体为湖南农业大学刘峰惠赠,1300flag-RUBY载体系统为湖南农业大学王中一惠赠。MgCl<sub>2</sub>溶液、乙酰丁香酮(AS)、2-吗啉乙磺酸(MES)等均采用分析纯试

剂配制。

## 1.2 方法

### 1.2.1 植物栽培

选择健康成熟的烟草和辣椒种子, 在无菌工作台上用6% $\text{H}_2\text{O}_2$ 浸泡15 min后进行表面消毒, 再以5 000 r/min离心1 min, 接着用dd $\text{H}_2\text{O}$ 冲洗4~5次。消毒后的种子在无菌条件下平板铺种于MS培养基中, 培养1~2周。将营养土(丹麦品氏泥炭种植土)、蛭石和珍珠岩按4:1:1的比例混合均匀作为移栽基质, 待幼苗长出2片子叶时, 将其移植至混合好的种植土中, 再将植物置于25℃、相对湿度为60%~80%的人工气候室中, 保持16 h的光照和8 h的黑暗光周期, 每周施肥2~3次。

### 1.2.2 表达载体的构建

根据辣椒PDS基因序列, 利用SnapGene4.1.9和DNAMAN6.0软件设计特异性引物, 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司进行人工合成。以

pBI121载体为出发载体, 采用双酶切的方法构建pBI121-*antiPDS*干扰表达载体(图1(a)), 选择Sma I和Sac I为酶切位点。将辣椒PDS基因片段和线性化载体加入重组反应体系中, 37℃孵育1 h。将反应产物转化至*E. coli* DH5 $\alpha$ 中, 通过PCR筛选阳性克隆。经测序验证后, 通过电击法将质粒转化至农杆菌菌株GV3101, 以待备用。

本研究中1300flag-RUBY和pTRV2-PDS重组载体均为已有载体, 无需重新构建。其中, 1300flag-RUBY载体融合了甜菜碱生物合成途径中的3个关键基因CYP76AD1、DODA和葡萄糖基转移酶(glucosyl transferase)基因, 并由CaMV 35S启动子驱动RUBY系统表达(图1(c))。pTRV2-PDS载体的核心功能模块由PEBV CP promoter(强启动子)、PEBVpro(病毒蛋白酶)和CMV2b(RNA沉默抑制子)等3个元件共同构成(图1(d))。该载体是病毒诱导基因沉默(VIGS)实验中常用的一种载体, 在本研究中作为报告基因使用, 以验证实验体系的有效性。

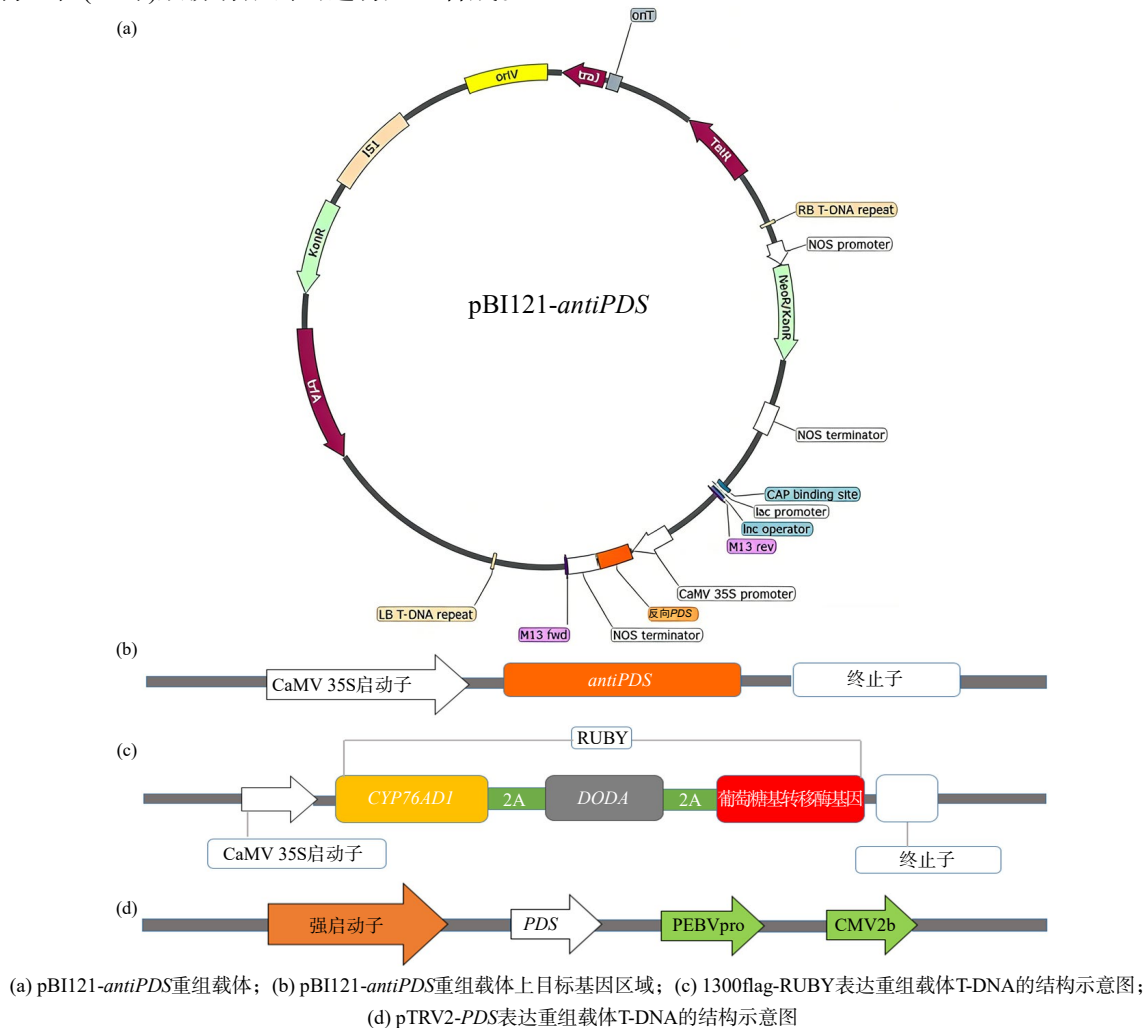


图1 表达重组载体的结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the recombinant expression vectors

### 1.2.3 重组质粒 pBI121-*antiPDS*、pTRV2-*PDS*、1300f lag-RUBY 农杆菌侵染液的制备

在 28 °C、180 r/min 条件下, 将农杆菌培养于含 25 μg/mL 利福平、50 μg/mL 庆大霉素和 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中。当 OD<sub>600 nm</sub> 达到 0.6~1.0 时, 以 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 再用 200 mL 转化工作液 (200 mmol/L 乙酰丁香酮、2 mol/L MgCl<sub>2</sub> 和 1 mol/L MES, pH 5.5~5.6) 重悬浮菌体, 调节 OD<sub>600 nm</sub> 至 0.5, 在 28 °C 避光静置 3~4 h。

### 1.2.4 农杆菌浸润在烟叶和辣椒中瞬时表达

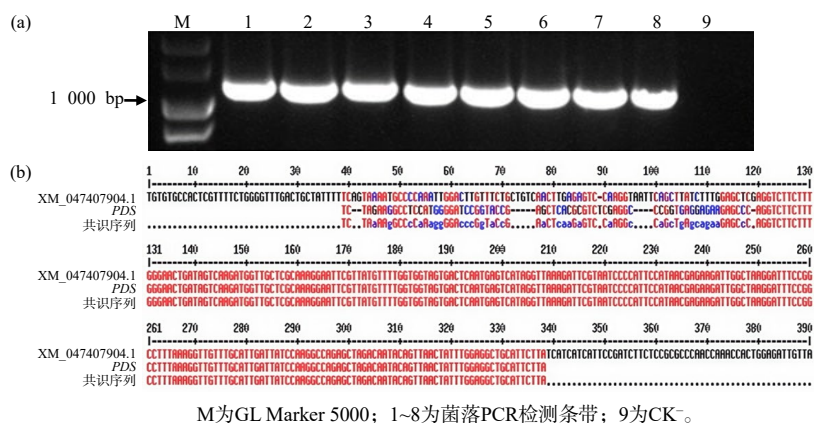
当本氏烟草和辣椒生长至 6 片叶时, 使用 1 mL 一次性注射器抽取适量上述农杆菌侵染液。选择合适的叶片, 用针头在叶片背面刺穿多个表面孔, 通过注射器喷嘴注入农杆菌侵染液, 确保浸满整个叶

片。注射后, 将烟草和辣椒置于 25 °C 黑暗培养 24 h 后, 转入人工气候室。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒 *PDS* 基因的扩增和鉴定

以农杆菌中提取的 *PDS* 基因为模板, 利用 PCR 技术在目的片段上、下游各 350 bp 处设计特异性引物进行扩增, 获得 1 000 bp 的特异性条带, 与预期大小一致 (图 2)。使用凝胶回收试剂盒回收序列条带, 将其与线性化的 Ti 质粒 pBI121 载体进行连接, 再将连接产物转化至 *E.coli* DH5α 受体细胞, 并使用 Kana 抗性平板筛选获得阳性克隆, 进一步通过菌液 PCR 鉴定及测序进行分子验证。序列比对分析结果显示, 辣椒 *PDS* 基因克隆成功。



(a) pBI121-*antiPDS* 菌落 PCR 扩增产物电泳图; (b) 目的片段与 *PDS* 基因序列的比对结果

图 2 辣椒 *PDS* 基因的检测验证结果

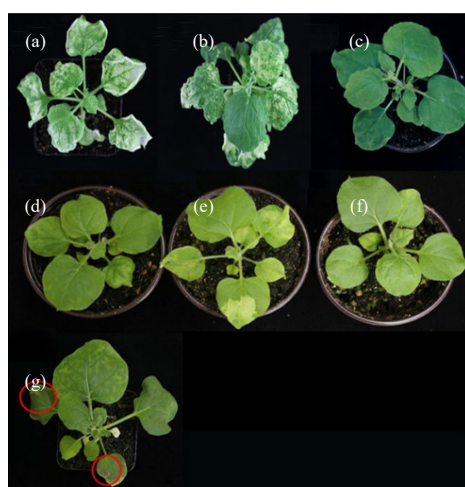
Fig. 2 Detection and verification results of the *PDS* gene in pepper

### 2.2 表达载体的结构验证

采用双酶切法将 *PDS* 基因与载体 pBI121 进行反向连接, 构建 pBI121-*antiPDS* 重组载体, 以生成辣椒中的 *PDS* 基因反义 RNA。将重组质粒转化至大肠埃希菌, 并随机挑取转化板上的多个单菌落, 进行单菌落 PCR 验证, 结果表明所选单菌落均为阳性克隆子。

### 2.3 烟草中几种报告基因系统的瞬时表达

将 *antiPDS* 和 VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默载体以及 RUBY 重组载体 (已有载体) 瞬时转化烟草叶片, 1 周后观察叶片的颜色变化。结果显示: VIGS 介导的 *PDS* 沉默组 (图 3(a)、图 3(b)) 叶片大部分区域都出现“漂白”现象; *antiPDS* 瞬时表达组 (图 3(e)) 仅叶片转化部位出现少量白色斑块, 表明瞬时表达的 *antiPDS* 在转化部位局部细胞内发生反义干扰作用; 在 RUBY 重组载体瞬时表达组 (图 3(g)) 中, 农杆菌侵染区域呈现



(a)、(b) VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默; (c)、(d) 野生型植株; (e) *antiPDS* 表达; (f) 野生型植株; (g) RUBY 系统表达

图 3 3 种报告基因系统在本氏烟草叶片中的瞬时表达表型

Fig. 3 Phenotypes following transient expression of three reporter gene systems in *Nicotiana benthamiana* leaves

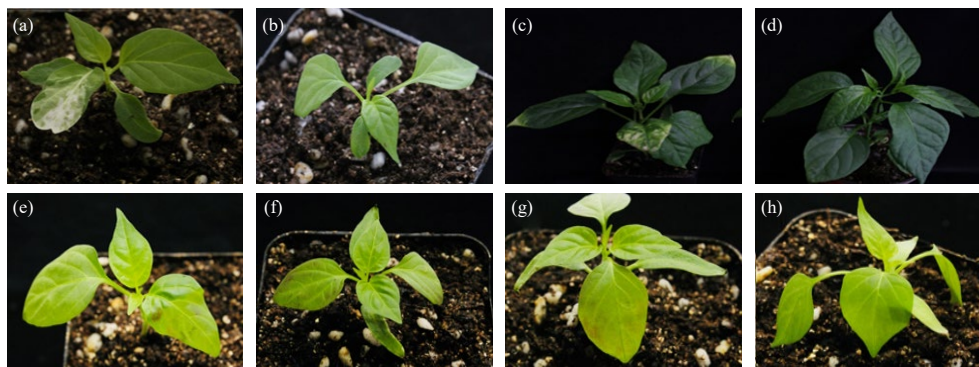


不同深浅的红色斑块,但没有广泛扩展。这些结果验证了重组载体 pTRV2-*PDS*、pBI121-*antiPDS*和 1300flag-RUBY 作为报告基因的有效性。

## 2.4 辣椒中几种报告基因的瞬时表达

采用农杆菌介导的瞬时转化技术,通过按压注射法分别将 VIGS 介导的 *PDS* 基因、RUBY 重组载体和 *antiPDS* 重组载体瞬时转化至辣椒叶片中,2 周后

观察叶片的颜色变化。结果显示:VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默导致辣椒叶片呈现明显的白化效应,且具有扩展性(图 4(a)); *antiPDS* 重组载体瞬时转化组的辣椒叶片同样出现局部白色斑块(图 4(c)); 而 RUBY 重组载体瞬时转化组的辣椒叶片在转化部位有区域性红色斑块(图 4(e)、图 4(f)、图 4(g))。



(a) VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默; (b) 野生型植株; (c) *antiPDS* 表达; (d) 野生型植株; (e)、(f)、(g) RUBY 系统表达; (h) 野生型植株

图 4 3 种报告基因系统在辣椒叶片中的瞬时表达表型

Fig. 4 Phenotypes following transient expression of three reporter gene systems in *Capsicum annuum* leaves

## 3 结论与讨论

辣椒遗传转化尚缺乏稳定的再生体系与转化方法,这在一定程度上限制了辣椒基因功能的研究及基因编辑的遗传改良应用<sup>[26-27]</sup>。植物瞬时转化最初在模式植物本氏烟草中建立,随后在多种植物中得到有效应用。本研究采用农杆菌介导的瞬时表达法,对辣椒和烟草叶片进行了 3 种报告基因系统的瞬时转化。结果表明:3 种报告基因系统在 2 种植物中均能实现基因的功能表达,但效率与表型强度存在差异;在烟草中,3 种报告基因系统均呈现显著表型,RUBY 系统的表达导致可见的红色色素沉积,*antiPDS* 与 VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默均引起叶片白化;而在辣椒中,RUBY 系统表达的红色色素积累较少,*antiPDS* 与 VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默虽也能引发白化现象,但程度低于烟草。总体来看,烟草的瞬时表达效果显著优于辣椒的,尤其以 VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默的白化表型最为突出。该差异可能源于 35S 启动子在 2 种植物中的转录活性不同,在烟草中表达强度更高;此外,辣椒叶片组织结构和防御反应可能影响农杆菌的侵染与基因递送效率,导致转化表达水平较低。

VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默在烟草和辣椒中表型均非常突出,因此常被首选用于验证瞬时表达效果。与 *antiPDS* 介导的反义干扰类似,VIGS 技术同

样通过靶向抑制目标基因表达,使植株呈现功能丧失型表型。*PDS* 是类胡萝卜素合成途径的关键基因,其沉默导致类胡萝卜素合成受阻,抑制叶绿素的合成,进而引发白化现象。尽管这种白化现象能直观验证瞬时表达效果,但它也可能对植物的正常生长发育产生负面影响,如光合作用效率降低、植株生长迟缓甚至死亡,这些不利影响虽然在瞬时表达中影响不大,但 VIGS 介导的 *PDS* 基因沉默不适用于稳定遗传转化筛选。相对而言,RUBY 系统具有功能获得性特征,避免了上述不利影响。HE 等<sup>[28]</sup>研究证实 RUBY 系统在水稻和拟南芥等多种植物中均表现出高效、稳定的遗传转化能力。YU 等<sup>[29]</sup>用浸花法将 RUBY 系统转移至紫苏、本氏烟草和拟南芥植物的毛状根,结果显示,甜菜碱不影响植物再生、发育或生育能力。因此,在辣椒遗传转化中 RUBY 系统更适合作为报告基因。但从转化后的表型上看,其红色显现水平还比较低,需要对其加以改造来提高表达水平,以进一步突显报告基因的效果。

## 参考文献:

- [1] SINDAROVSKAYA R, GOLOVACH I S, BELOKUROVA V B, et al. Screening of plant cell culture collection for efficient host species for *Agrobacterium*-mediated transient expression[J]. Cytology and Genetics, 2014, 48(4): 208-217.
- [2] GEISSE S, VOEDISCH B. Transient expression

- technologies: past, present, and future[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 899: 203–219.
- [3] PURKAYASTHA A, DASGUPTA I. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(11/12): 967–976.
  - [4] RHEE S J, JANG Y J, PARK J Y, et al. Virus- induced gene silencing for in planta validation of gene function in cucurbits[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(4): 2366–2379.
  - [5] WANG X Y, TENG C, LYU K D, et al. Application of *AtMYB75* as a reporter gene in the study of symbiosis between tomato and *Funneliformis mosseae*[J]. *Mycorrhiza*, 2023, 33(3): 181–185.
  - [6] 邹杰, 刘媛. 水稻*OsRZFP34*基因逆境表达特征及其启动子的克隆与分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 46(6): 670–678.
  - [7] 段学清, 郑莉茹, 刘文波, 等. GFP绿色荧光法辅助筛选玉米转基因植株[J]. *玉米科学*, 2017, 25(2): 31–38.
  - [8] 龙华, 尾里建二郎, 若松佑子, 等. 红色荧光蛋白(RFP)基因在转基因青鳞中的表达[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(2): 97–99, 194.
  - [9] BAI C, CAPELL T, BERMAN J, et al. Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 195–205.
  - [10] WANG M, WANG G, JI J, et al. The effect of *pds* gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants[J]. *Plant Science*, 2009, 177(3): 222–226.
  - [11] KOSCHMIEDER J, FEHLING-KASCHEK M, SCHAUB P, et al. Plant-type phytoene desaturase: functional evaluation of structural implications[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187628.
  - [12] NTUI V O, TRIPATHI J N, TRIPATHI L. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain(*Musa* spp.)[J]. *Current Plant Biology*, 2020, 21: 100128.
  - [13] NAIM F, DUGDALE B, KLEIDON J, et al. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9[J]. *Transgenic Research*, 2018, 27(5): 451–460.
  - [14] KAUR N, ALOK A, SHIVANI, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in *phytoene desaturase*(PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2018, 18(1): 89–99.
  - [15] NAING A H, KYU S Y, PE P P W, et al. Silencing of the phytoene desaturase(*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes[J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 110.
  - [16] SRINIVASAN R, BABU S, GOTHANDAM K M. Accumulation of phytoene, a colorless carotenoid by inhibition of phytoene desaturase(PDS) gene in *Dunaliella salina* V-101[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 242: 311–318.
  - [17] 张博超. 基于转录组测序技术的番茄组织特异性基因评估与验证及基因表达分析[D]. 上海: 上海师范大学, 2024.
  - [18] CHOO K Y, ONG Y Y, LIM R L H, et al. Study on bioaccessibility of betacyanins from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*)[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(4): 1163–1169.
  - [19] PRAMANIK D, LEE K, WANG K. A simple and efficient method for betalain quantification in *RUBY*-expressing plant samples[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1449409.
  - [20] WANG D, ZHONG Y, FENG B, et al. The *RUBY* reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(8): 1707–1715.
  - [21] CHEN L, CAI Y P, LIU X Q, et al. The *RUBY* reporter for visual selection in soybean genome editing[J]. *aBIOTECH*, 2024, 5(2): 209–213.
  - [22] WAHYUNI Y, BALLESTER A R, SUDARMONOWATI E, et al. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(4): 783–793.
  - [23] GU L B, PANG H L, LU K K, et al. Process optimization and characterization of fragrant oil from red pepper (*Capsicum annuum* L.) seed extracted by subcritical butane extraction[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(6): 1894–1903.
  - [24] CAO Z Z, ZHOU L Y, BI J F, et al. Effect of different drying technologies on drying characteristics and quality of red pepper(*Capsicum frutescens* L.): a comparative study[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(10): 3596–3603.
  - [25] KIM S, PARK M, YEOM S I, et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 270–278.
  - [26] 陈莹, 王瑾, 崔清志, 等. 辣椒花药颜色突变体*Caya*表型特征分析及遗传定位[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(6): 661–666.
  - [27] LEE Y H, KIM H S, KIM J Y, et al. A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 23(1): 50–58.
  - [28] HE Y B, ZHANG T, SUN H, et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 152.
  - [29] YU J J, DENG S L, HUANG H, et al. Exploring the potential applications of the noninvasive reporter gene *RUBY* in plant genetic transformation[J]. *Forests*, 2023, 14(3): 637.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 罗 维