

病毒诱导的基因沉默技术在双子叶植物中的应用研究进展

张琴琴,纪兆林,朱峰

(扬州大学园艺与植物保护学院,江苏扬州 225009)

摘要:病毒诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)是能够快速鉴定基因功能的反向遗传学重要方法之一,是一种RNA水平转录后的基因沉默现象。因其具有试验周期短、操作方法简单、成本低、效率高、获得表型快以及高通量等优点,被大量运用于植物基因功能研究中。阐述了VIGS技术的作用机制,综述了VIGS技术在茄科、豆科、蔷薇科、葫芦科、锦葵科和菊科等双子叶植物中的应用及存在的问题,对前景进行展望,为进一步拓展VIGS的应用提供参考。

关键词:病毒诱导的基因沉默;双子叶植物;茄科;豆科;蔷薇科;葫芦科;锦葵科;菊科

中图分类号: Q943.2; S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2020)02-0001-08

Application Advance of Virus-Induced Gene Silencing Technology in Dicotyledons

ZHANG Qinqin, JI Zhaolin, ZHU Feng

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) is one of the most important methods that can quickly identify gene function, and it is a kind of post-transcriptional gene silencing phenomenon at the level of RNA. Because of its lots of benefits, such as short experimental period, simple operation method, low cost, high efficiency, fast phenotype and high throughput, it has been widely used by researchers for researching plant gene function. This paper further explains the mechanism, application, problems and prospects of VIGS technology in dicotyledons including Solanaceae, Leguminosae, Rosaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae and Compositae, which will provide a reference for further expanding the application of VIGS.

Key words: Virus-induced gene silencing (VIGS); Dicotyledons; Solanaceae; Leguminosae; Rosaceae; Cucurbitaceae; Malvaceae; Compositae

病毒诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术是近20 a发展起来的能够快速鉴定基因功能的反向遗传学重要方法之一,是发生在RNA水平转录后的基因沉默现象^[1-2]。VIGS最早被用来描述植物受病毒侵染后症状的恢复情况,当植物被病毒侵染时,携带目的基因的病毒载体会使植物的表达水平下降,从而确定基因在植物中的功

能^[3]。随着后基因组时代的到来,众多植物已先后完成全基因组测序工作。为确定基因的功能,需要进行进一步的鉴定。VIGS技术具有成本低、试验周期短、效率高、方法操作简单、获得表型快以及高通量等优点^[4],被广泛应用于植物基因功能研究中。双子叶植物在自然界约有200 000个物种,分布广泛,具有重要的经济价值。VIGS技术已经在双子叶

收稿日期:2019-05-15

基金项目:扬州大学“青蓝工程”;现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30-3-02)

作者简介:张琴琴(1998-),女,江苏宿迁人,本科,主要从事植物病理学与分子生物学研究。E-mail:2236104570@qq.com

通信作者:朱峰(1985-),男,江西九江人,副教授,博士,主要从事植物病理与分子生物学研究。

E-mail:zhufeng@yzu.edu.cn

植物中广泛应用,然而还未见 VIGS 在双子叶植物中应用的综述。鉴于此,阐述 VIGS 技术的作用机制,综述 VIGS 技术在茄科、豆科、蔷薇科、葫芦科、锦葵科和菊科等双子叶植物中的应用及存在的问题,并对前景进行展望。

1 VIGS 技术的作用机制

转录后基因沉默可抑制植物受病毒的侵染,是植物中天然存在的免疫系统^[5-6]。基因沉默现象主要在稳定生物基因组、识别和抑制外源基因表达,以及防止病毒和转座子入侵方面具有重要作用^[7]。在进化过程中,植物进化出许多防御病毒入侵的机制,VIGS 是其中的一种。利用病毒载体携带目的基因 cDNA 片段,在病毒复制和转录过程中,诱导序列同源基因 mRNA 的降解或甲基化,来实现对基因功能的鉴定。在 RNA 聚合酶作用下病毒载体携带目的基因 cDNA 片段形成双链 RNA,这种双链 RNA 作

为复制中间体,是沉默过程中关键的激发子,其被切割成 21~24 个核苷酸小分子干扰 RNA,切割物是 RNase III 家族特异性核酸内切酶 Dicer 的类似物^[8]。在植物中,RNA 聚合酶扩增小分子干扰 RNA,以单链形式和一些蛋白质结合形成 RNA 诱导复合物,在小分子干扰 RNA 指导下,诱导复合物与病毒 mRNA 互补配对,以序列特异性方式对目的基因进行剪切^[7],从而使靶基因 mRNA 发生特异性降解,导致目的基因在 RNA 水平上沉默^[9-14]。

2 VIGS 技术在双子叶植物中的应用

双子叶植物约有 200 000 个物种,在世界范围内广泛分布,双子叶植物有木兰科、十字花科、葫芦科、山茶科、锦葵科、蔷薇科、豆科、菊科、茄科、旋花科等。选择合适的 VIGS 载体对研究植物基因功能具有重要作用,已有大量 VIGS 载体应用于双子叶植物,如表 1 所示。

表 1 VIGS 载体在双子叶植物中的应用

Tab. 1 Application of VIGS in dicotyledons

VIGS 载体	病毒种类	沉默双子叶植物	沉默组织	参考文献
VIGS vector	Species of virus	Silent dicotyledons	Silent organization	Reference
RNA 病毒载体	烟草花叶病毒	本生烟	叶	[15]
RNA virus vector	(Tobacco mosaic virus, TMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaf	
	马铃薯 X 病毒	马铃薯、本生烟	叶	[16]
	(Potato virus X, PVX)	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaf	
	烟草脆裂病毒	本生烟、番茄、马铃薯、辣椒、拟南芥、苹果等	叶、茎、花、果实	[17-21]
	(Tobacco rattle virus, TRV)	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Capsicum annuum</i> L., <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Malus pumila</i> Mill.	Leaf, stem, flower, fruit	
	豌豆早褐病毒	豌豆	叶、茎、根、花、豆荚	[22]
	(Pea early-browning virus, PEBV)	<i>Pisum sativum</i> Linn.	Leaf, stem, root, flower, pod	
	黄瓜花叶病毒	大豆、本氏烟	叶、种子	[23]
	(Cucumber mosaic virus, CMV)	<i>Glycine max</i> (Linn.) Merr., <i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaf, seed	
	豆荚斑驳病毒	大豆	叶	[24]
	(Bean pod mottle virus, BPMV)	<i>Glycine max</i> (Linn.) Merr	Leaf	

续表 1 VIGS 载体在双子叶植物中的应用
Tab. 1 (Continued) Application of VIGS in dicotyledons

VIGS 载体 VIGS vector	病毒种类 Species of virus	沉默双子叶植物 Silent dicotyledons	沉默组织 Silent organization	参考文献 Reference
	苹果潜隐球状病毒 (Apple latent spherical virus, ALSV)	本氏烟、拟南芥、大豆 <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Glycine max</i> (Linn.) Merr	叶 Leaf	[25]
	烟草环斑病毒 (Tobacco ringspot virus, TRSV)	本氏烟、拟南芥 <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶、花、果实 Leaf, flower, fruit	[26]
DNA 病毒载体 DNA virus vector	番茄金色花叶病毒 (Tomato golden mosaic virus, TGMV)	本氏烟 <i>Nicotiana benthamiana</i>	叶 Leaf	[27-29]
	甘蓝曲叶病毒 (Cabbage leaf curl virus, CbLCV)	拟南芥、本生烟 <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>	叶 Leaf	[27]
	非洲木薯花叶病毒 (African cassava mosaic virus, ACMV)	木薯、本生烟 <i>Manihot esculenta</i> Crantz, <i>Nicotiana benthamiana</i>	叶 Leaf	[30]
卫星病毒和 卫星 DNA 载体 Satellite viruses and satellite DNA vectors	卫星烟草花叶病毒 (Satellite of tobacco mosaic virus, STMV)	普通烟 <i>Nicotiana benthamiana</i>	叶、花 Leaf, flower	[31]
	中国番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	叶、茎、果实、根 Leaf, stem, fruit, root	[32-33]
	烟草曲茎病毒 (Tobacco curly shoot virus, TbCSV)	本生烟 <i>Nicotiana benthamiana</i>	叶 Leaf	[34]
	棉花皱缩病毒 (Cotton leaf crumple virus, CLCrV)	棉花 <i>Gossypium</i> spp.	叶 Leaf	[35]

2.1 VIGS 技术在茄科植物中的应用

茄科植物是重要的经济与药用植物,伴随茄科植物基因组测序的完成,需要对众多基因功能进行鉴定,VIGS 技术已广泛应用于茄科植物,如用于研究茄科植物生长发育相关基因的功能、鉴定茄科植物代谢产物生物合成途径调控基因的功能、解析茄科植物防御真菌病害信号传导路径中抗性相关基因的功能^[36]等。由于 VIGS 发生在 RNA 转录后,不需要遗传转化,并且可以在植物中观察和测量出目的基因沉默后的生理生化指标,因此可以方便快捷地鉴定植物生长发育相关调控基因的功能。目前,TRV 载体已广泛应用于茄科植物^[37]。通过研究 TRV 载体的 VIGS 体系,实现对番茄和本生烟 *MSH1* 基因的沉默,证明 *MSH1* 基因可以调控植物发育。

另外,VIGS 技术已经应用于研究茄科植物代谢调控相关基因的功能,解析了茄科植物光合过程中生物碱生物合成、酚类次生代谢物生物合成、萜烯类化合物代谢调控,以及必需色素合成代谢途径中多种关键基因的功能。

随着 VIGS 技术的发展,其已有效运用于鉴定茄科植物非生物胁迫与应答生物信号调控网络中关键基因的功能,研究与植物-细菌互作、植物-真菌互作、抗病毒、抗植食性害虫、抗线虫以及耐热、抗旱等相关的基因。另外,VIGS 技术在抗病毒病方面也有相关应用,如通过将病毒基因片段导入植物,沉默该基因,使植物对这种病毒或有亲缘关系的其他病毒产生抗性。除此之外,VIGS 技术也在番茄抗叶霉病、抗白粉病、果实成熟调控以及果实抗冻中有应

用^[38]。VIGS 技术用于研究番茄叶霉病时,构建 TRV 载体沉默 *NRC1* 基因(NB-LRR protein required for HR associated cell death 1),从而抑制 *Cf-4* 和 *Avr4* 的相互作用,表明 *NRC1* 基因在抗番茄叶霉病基因介导的抗病反应中发挥重要作用^[39]。此外,运用该技术沉默 *ACRE276* 基因,证明在抗叶霉菌过程中,该基因是一种必需基因^[40]。通过 TRV-VIGS 技术对功能基因组学进行研究,筛选并鉴定病害中的防卫反应基因,沉默具有高抗白粉病的番茄植株 *S. habrochaites* G1.1560(含抗病基因 *Ol-1*),找到了 *ShGSTU1*(编码谷胱甘肽转移酶)、*ShME1*(编码 NADP 苹果酸酶)、*ShMADSTF*(编码 MADS 盒转录因子)、*ShORR-1*(功能未知新基因)4 个和白粉病相关的基因^[41]。此外,通过 VIGS 技术,已经研究出在番茄果实成熟过程乙烯合成途径中关键调控因子的功能。例如,番茄 ACC 氧化酶(*LeACO1*)在乙烯合成途径中起重要作用,表达下调抑制番茄果实成熟^[42]。另外,番茄 F-box 基因 *SIEBF* 作为乙烯信号途径中的负调控子,通过构建 TRV-VIGS 体系在番茄中同时沉默基因 *SIEBF* 和 *SIEBF2*,沉默植株出现生长缓慢、衰老加快、果实早熟等现象^[43]。牛义岭等^[44]在以 *SIGLD1* 基因构建 pTRV2-*SIGLD1* 载体时发现,*SIGLD1* 和番茄耐低温相关,对番茄抗冻研究具有重要意义。可见,VIGS 已在常见的茄科植物基因功能研究中广泛应用。

2.2 VIGS 技术在豆科植物中的应用

近年来,栽培大豆的基因组测序工作已完成,构建了野生大豆泛基因组,并不断地完善大豆种质资源的测序数据^[45]。在大豆研究过程中,筛选优良性状基因、对基因功能进行验证已经成为研究热点。近十几年来,已有诸如黄瓜花叶病毒(CMV)、豆荚斑驳病毒(BPMV)和苹果潜隐球状病毒(ALSV)等多种 VIGS 病毒载体成功应用于豆科植物基因功能的研究中(表 1)。在对豌豆枯叶病毒(PWV)进行探索的过程中,为沉默 *PDS* 基因,将携带 *PDS* 基因的 cDNA 片段插入到病毒载体的单链 RNA2 中,之后侵染豌豆^[46]。VIGS 技术应用于豆科植物,既不会影响豆科植物与根瘤菌共生形成根瘤,也不会对豌豆开花及结荚成熟产生影响^[47]。利用 RNA 病毒载体可对系统免疫相关基因以及抗性相关基因功能进行鉴定。例如,COOPER 等^[48]利用豆荚斑驳病毒(BPMV)系统沉默 *Rpp1*,导致大豆丧失对根腐病的免疫功能,表明 *Rpp1* 基因调控的根腐病免疫途径以及相关基因与大豆防御系统紧密相关。此外,代谢途径中相关的功能基因也可以通过 VIGS 技术进行

鉴定,例如,利用黄瓜花叶病毒(CMV)构建 *CHS*(编码查尔酮合成酶)-VIGS 病毒系统,沉默查尔酮合成酶基因,使大豆种皮由棕变黄^[49]。将 VIGS 技术应用于豆科植物不同发育时期不同组织,也可使用 RNA 病毒。例如,在不同时间和空间对豆荚斑驳病毒(BPMV)建立基因沉默体系,试验中花、茎、叶和根均沉默了 *GFP* 基因,但沉默效果在不同组织中表现不同,花和叶中沉默效果最强,几乎全部沉默,茎沉默效果次于花和叶,根沉默效果最弱。试验结果对反向遗传学在不同组织中的研究具有参考价值^[50]。

2.3 VIGS 技术在蔷薇科植物中的应用

蔷薇科植物有桃、草莓、苹果等,具有较高的经济价值,在世界范围内分布广泛。据研究,花色苷合成过程中第 1 个酶是查尔酮合成酶,这种酶在影响桃果皮色泽形成过程中具有重要作用。通过 TRV 载体介导的 VIGS 技术研究 *CHS* 沉默对桃果实花色苷代谢的影响^[51-52]。结果显示,抑制 *CHS* 基因降低了桃果皮中槲皮素糖苷和花青素糖苷的含量,可将花色苷代谢途径向绿原酸及其复合物方向转换。证实 *CHS* 是能够控制类黄酮代谢方向的物质,并在花色苷代谢途径中发挥重要作用^[51-52]。另外,研究者利用 TRV 介导的 VIGS 技术,以 *GFP* 和 *PDS* 为标记基因,在草莓中构建 VIGS 体系,研究 VIGS 技术是否可以应用于草莓^[53]。研究发现,利用紫外灯和荧光显微镜可以筛选出 *GFP* 沉默的植株,沉默植株的果实和叶片出现光漂白现象,*PDS* 在沉默植株中的表达量明显下降,表明 TRV 介导的 VIGS 体系在草莓中成功构建。此外,研究者通过构建 TRV-VIGS 载体研究澳洲青苹,沉默转录因子 *MdHB-1* 基因,分析其对果实乙烯合成过程中关键基因 *MdACO1* 的表达及果实成熟相关指标的影响^[54]。结果表明,抑制 *MdHB-1* 基因可以降低 *MdACO1* 的表达量,延缓果实成熟衰老^[54]。

2.4 VIGS 技术在葫芦科植物中的应用

葫芦科植物有西葫芦、葫芦、丝瓜、香瓜、西瓜和黄瓜等,在蔬菜和水果中占有重要地位。ALSV 是首次报道可用于葫芦科作物构建 VIGS 的病毒载体^[55]。将克隆后的黄瓜叶片八氢番茄红素脱氢酶(*PDS*)基因和 *SU* 基因(300 bp)重组到 ALSV-RNA2 中,介于 *MP* 和 *Vp25*,构建 ALSV-*PDS* 和 ALSV-*SU* 2 个载体,将载体导入西葫芦、葫芦、丝瓜、香瓜、西瓜和黄瓜等葫芦科植物的子叶。结果表明,导入 ALSV-*PDS* 的葫芦科作物均具有光漂白表型,其表型与敲除 *PDS* 基因相似,说明导入 ALSV-*PDS* 载体的植物

内源 *PDS* 基因已被沉默。并且在葫芦科作物中导入 *ALSV-SU* 载体,均会出现黄叶表型,其与 *SU* 基因被抑制的表型状况相一致,说明导入 *ALSV-SU* 载体可使 *SU* 基因沉默^[56]。

2.5 VIGS 技术在锦葵科植物中的应用

锦葵科植物以富含纤维著称,具有重要经济价值。近年来,在棉花基因功能研究方面 VIGS 技术已广泛应用。利用 VIGS 技术可发掘棉花中特异性基因,如与抗逆或品质相关的功能基因。例如 *Gh-CPK* 基因与黄萎病抗病有关^[57],通过构建 *TRV-VIGS* 体系,将棉花中 *GhCPK* 基因沉默后,发现基因沉默的棉花对黄萎病更加敏感,发病指数更高,表明 *GhCPK* 基因可能与棉花黄萎病信号调控途径有关。穆春等^[58]利用 *pTRV-GhCTR1* 沉默载体侵染棉花,发现侵染植株的 *GhCTR1* 基因表达水平显著降低,表明 VIGS 技术可用于研究棉花基因功能。

2.6 VIGS 技术在菊科植物中的应用

菊花是重要的园艺观赏花卉,花瓣的生长对花卉的品质有重要作用,因此对与花瓣生长相关的基因进行研究十分必要。利用金黄色非洲菊品种深圳 5 号(S5)的舌状花花瓣,以葡糖苷酸酶基因 *GUS* 为基础,建立非洲菊花瓣瞬时表达系统。利用花色素苷合成途径中关键转录因子 *GMYP10* 基因,以 *pTRV2* 为表达载体,将 *GMYP10* 连接到载体上,建立非洲菊花瓣的 VIGS 系统^[59],该系统对研究非洲菊花瓣分子发育机制及相关植物具有重要作用。在菊科植物中,报告基因对植物花瓣颜色有影响,选择正确报告基因可有效衡量沉默效果^[60]。选择 *GMYP10* 作为报告基因,在非洲菊花瓣构建 *pTRV2-GMYP10* 载体,利用 *GMYP10* 基因编码的 MYB 类转录因子,促进下游结构基因表达,从而合成花色素苷,进而对花色形成有作用^[61-62]。

3 VIGS 技术应用于双子叶植物存在的问题和前景展望

VIGS 技术与传统鉴定基因的方法相比,具有试验周期短、方法操作简单、成本低、效率高、获得表型快以及高通量等优点,被广泛应用于研究植物的生长发育、抗病抗逆、代谢调控等生理过程。然而随着研究的不断深入,VIGS 技术在应用过程中也存在一定的局限性,例如 VIGS 技术存在功能敲除不彻底、基因沉默脱靶、持续时间有限、沉默不均一等问题。基因沉默不彻底是 VIGS 技术的最大问题,对于只需积累少量转录本就可获得足够蛋白质的基因来说,利用 VIGS 技术难以对其功能进行鉴定。基因

沉默不均一,即基因在植株某些部位沉默效率高,某些部位沉默效率低。基因沉默水平在不同植株间也表现出不同效应,有些沉默植株只在局部产生表型,而基因沉默后不产生明显表型^[63]。VIGS 技术引起的沉默持续时间有限,一般有效沉默期约 30 d,之后将出现基因沉默衰减和表型恢复等现象,对于生长周期较长的植物,30 d 的沉默期明显不够^[64]。另外,VIGS 技术会导致沉默脱靶,利用相关软件及核酸数据库寻找特异序列,可避免脱靶效应,提高目的基因沉默准确度。在植物体内积累一定量的 dsRNA 是基因沉默所必须的,当处理一些少量表达基因时,VIGS 技术会导致少量表达的基因沉默效果不佳^[65]。另外,同时存在相同或相似基因序列时,会同时受到 VIGS 的干扰,此时将不能明确引起沉默现象具体基因。利用 VIGS 技术对幼苗或植物局部转导的基因不具有遗传性,不能用于研究种子发芽和幼苗早期生长。有效沉默目的基因、优化 VIGS 体系、提高载体利用效率等,仍是 VIGS 技术所面临的亟需解决的问题。通过不断改良与优化 VIGS 技术在一定程度上可以解决以上问题,如为了提高载体的沉默效率,利用“Fruit-VIGS”、Gateway、人工 miRNA 等载体增加 VIGS 技术的应用范畴^[66-70]。通过不断发展分子生物学以及不断深入解析基因沉默机制,最终可弥补一些 VIGS 技术方面的不足。例如基因表型不稳定和基因沉默效率低等问题,可通过建立更加高效准确的 VIGS 技术体系解决。随着 VIGS 机制的深入解析以及分子生物学技术的进一步发展,相信未来一定能够克服 VIGS 技术存在的缺陷和不足,建立更为精准和高效的 VIGS 体系,使其在植物功能基因研究中得到更广泛的应用。

参考文献:

- [1] 姚丙晨,孙玥,孙林静,等. 病毒诱导的基因沉默的发展及在植物生物逆境上的应用[J]. 中国农学通报, 2016, 32(9):131-136.
YAO B C, SUN Y, SUN L J, et al. Development of virus induced gene silencing and application of VIGS in plant abiotic stresses [J]. Chinese Science Bulletin, 2016, 32 (9):131-136.
- [2] LUCIOLI A, NORIS E, BRUNETTI A, et al. Tomato yellow leaf curl sardinia virus rep-derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated[J]. Journal of Virology, 2003, 77(12):6785-6798.
- [3] RATCLIFF F, HARRISON B D, BAULCOMBE D C. A similarity between viral defense and gene silencing in

- plants[J]. *Science*, 1997, 276(5318): 1558-1560.
- [4] 杨迎伍, 李正国, 宋红丽, 等. VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(2): 379-383.
- YANG Y W, LI Z G, SONG H L, *et al.* Application of VIGS in plant gene function study[J]. *Plant Physiology Communication*, 2007, 43(2): 379-383.
- [5] LU R, MARTIN-HERNANDEZ A M, PEART J R, *et al.* Virus-induced gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30(4): 296-303.
- [6] BURCH-SMITH T M, ANDERSON J C, MARTIN G B, *et al.* Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(2): 734-746.
- [7] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363.
- [8] 宋震, 李中安, 周常勇. 病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 研究进展[J]. *园艺学报*, 2014, 41(9): 1885-1894.
- SONG Z, LI Z A, ZHOU C Y. Research advances of virus-induced gene silencing (VIGS) [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2014, 41(9): 1885-1894.
- [9] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [10] KLAHRE U, CRETE P, LEUENBERGER S A, *et al.* High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(18): 11981-11986.
- [11] MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, URLAUB H, *et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi [J]. *Cell*, 2002, 293(5): 563-574.
- [12] WATERHOUSE P M, GRAHAM M W, WANG M B. Virus resistance and gene silencing in plants is induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(23): 13959-13964.
- [13] 赵爽, 王琦, 李艳红. 植物病毒诱导的基因沉默效应的分子机制 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(2): 384-390.
- ZHAO S, WANG Q, LI Y H. Molecular mechanism of virus induced gene silencing by plant [J]. *Plant Physiology Communication*, 2007, 43(2): 384-390.
- [14] ANNETTE B, LANGE M. VIGS-genomics goes functional [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(1): 1-4.
- [15] DARNET S, RAHIER A. Plant sterol biosynthesis: Identification of two distinct families of sterol 4 α -methyl oxidases [J]. *Biochemical Journal*, 2004, 378(3): 889-898.
- [16] THOMAS C L, JONES L, BAULCOMBE D C, *et al.* Size constraints for targeting posttranscriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2001, 25(4): 417-425.
- [17] RYU C M, ANAND A, KANG L, *et al.* Agrodrench: A novel and effective agroinoculation method for virus induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous species* [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2004, 40(2): 322-331.
- [18] BRIGNETI G, MARTIN-HERNANDEZ A M, JIN H, *et al.* Virus induced gene silencing in *Solanum* species [J]. *Plant Journal*, 2004, 39(2): 264-272.
- [19] SENTHIL-KUMAR M, HEMA R, ANAND A, *et al.* 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 [J]. *New Phytologist*, 2007, 176(4): 782-791.
- [20] ZHU F, ZHANG P, LIN H H, *et al.* Construction of VIGS expression vector carrying *NbSABP2* and *NbSAMT* genes cloned from *Nicotiana benthamiana* [J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2012, 49(2): 453-458.
- [21] 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]. *De Gruyter*, 2019, 10(6): 151-159.
- [22] FOFANA I B F, SANGARE A, COLLIER R, *et al.* A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4): 613-624.
- [23] OTAGAKI S, ARIA M, TAKAHASHI A, *et al.* Rapid induction of transcriptional and posttranscriptional gene silencing using a novel cucumber mosaic virus vector [J]. *Plant Biotechnology*, 2006, 23(3): 259-265.
- [24] ZHANG C, GHABRIAL S A. Development of bean pod mottle virus base vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean [J]. *Virology*, 2006, 344(2): 401-411.
- [25] PFLIEGER S, RICHARD M S, BLANCHET S. VIGS technology: An attractive tool for functional genomics studies in legumes [J]. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(12): 1234-1248.
- [26] ZHAO F, LIM S, IGORI D, *et al.* Development of tobacco ring spot virus-based vectors for foreign gene expression and virus-induced gene silencing in a variety of plants [J]. *Virology*, 2016, 492: 166-178.
- [27] ASCENCIO J T, SETTLAGE S B. DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus induced gene silencing [J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 142(2): 198-203.
- [28] KJEMTRUP S, SAMPSON K S, PEELE C G, *et al.* Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 1998, 14

- (1):91-100.
- [29] PEELE C, JORDAN C V, MUANGSAN N, *et al.* Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors[J]. *Plant Journal*, 2001, 27(4):357-366.
- [30] FOFANA I B F, SANGARE A, COLLIER R, *et al.* A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4):613-624.
- [31] GOSSELE V, FACHE I, MEULEWAETER F, *et al.* Sviss-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants[J]. *Plant Journal*, 2002, 32:859-866.
- [32] GUO Y S, HUANG C J, XIE Y. A tomato glutaredoxin gene *SLGRX1* regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses[J]. *Planta*, 2010, 232(6):1499-1509.
- [33] TAO X P, ZHOU X P. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants[J]. *Plant Journal*, 2004, 38(5):850-860.
- [34] QIAN Y J, MUGIIRA R B, ZHOU X P. A modified viral satellite DNAbase gene silencing vector is effective in association with heterologous begomoviruses[J]. *Virus Research*, 2006, 118:136-142.
- [35] TUTTLE J R, IDRIS A M, BROWN J K, *et al.* Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1):41-50.
- [36] 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.
- QU L, LI Y L, AN W. Applications of virus induced gene silencing for analysis of gene function in Solanaceae species[J]. *Journal of Henan Agricultural Science*, 2018, 47(7):8-19.
- [37] 刘冠, 赵婷婷, 杨欢欢, 等. VIGS 在几种番茄真菌性病害的应用[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(9):2377-2382.
- LIU G, ZHAO T T, YANG H H. The applications of VIGS in several fungal diseases of tomato[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(9):2377-2382.
- [38] 张晓梦, 赵君. 病毒诱导的基因沉默在植物抗病基因功能研究中的应用[J]. *中国马铃薯*, 2013, 27(3):181-186.
- ZHANG X L, ZHAO J. Progress in study of plant resistance gene function using virus induced gene silencing system[J]. *Chinese Potato*, 2013, 27(3):181-186.
- [39] GABRI S H, VOSSEN J H, EKENGREN S K, *et al.* An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra and intracellular resistance proteins[J]. *The Plant Journal*, 2007, 50(1):14-28.
- [40] YANG C W, GONZALEZ-LAMOTHE R, EWAN R A, *et al.* The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* plant U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4):1084-1098.
- [41] 裴冬丽. 番茄白粉病抗性反应关键基因的鉴定及功能验证[D]. 郑州:河南农业大学, 2011.
- PEI D L. Identification and functional analysis of key genes for tomato resistance to powdery mildew[D]. Zhengzhou:Henan Agricultural University, 2011.
- [42] LIN Z, HONG Y, YIN M, *et al.* A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(2):301-310.
- [43] YANG Y, WU Y, PIRRELLO J, *et al.* Silencing *Sl-EBF1* and *Sl-EBF2* expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(3):697-708.
- [44] 牛义岭, 姜秀明, 许向阳. 番茄 GRAS 转录因子家族基因 *SIGLD1* 的克隆及 VIGS 载体构建[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(8):2155-2160.
- NIU Y L, JIANG X M, XU X Y. Cloning and VIGS vector construction of GRAS transcription factors family gene *SIGLD1* from tomato[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8):2155-2160.
- [45] YING H L, SHAN C Z, JIAN X M. Molecular footprints of domestication and improvement in soybean revealed by whole genome resequencing[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1):579-590.
- [46] CONSTANTIN G D, KRATH B N, MACFARLANE S A. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species[J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(4):622-631.
- [47] 王爽, 郭兵福, 郭勇, 等. 病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术及其在大豆基因功能研究和育种中的应用潜力[J]. *大豆科学*, 2016, 35(4):536-540.
- WANG S, GUO B F, GUO Y, *et al.* Virus-induced gene silencing and its usage in soybean functional genomics[J]. *Soybean Science*, 2016, 35(4):536-540.
- [48] COOPER B, CAMPBELL K B, MCMAHON M B. Disruption of Rpp1-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2013, 8(12):e27543.
- [49] NAGAMATSU A, MASUTA C, SENDA M. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(6):778-790.
- [50] JUVALE P S, HEWEZI T, ZHANG C. Temporal and spatial bean pod mottle virus-induced gene silencing in soybean[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(9):1140-1148.
- [51] 闵德栋, 张新华, 季娜娜, 等. TRV 介导 VIGS 技术在果蔬基因功能研究中的应用[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(2):159-166.
- MIN D D, ZHANG X H, JI N N, *et al.* The application of

- TRV-mediated VIGS technique in the study of gene function in fruits and vegetables[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(2): 159-166.
- [52] 张蕾,朱立新,徐川. 查尔酮合酶基因对桃果实花色苷代谢的影响[J]. *园艺学报*, 2015, 42(1): 31-37.
ZHANG L, ZHU L X, XU C. The effect of silencing chalcone synthase on anthocyanin metabolism in peach[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2015, 42(1): 31-37.
- [53] TIAN J, CHENG L, HAN Z Y, *et al.* Tobacco rattle virus mediated gene silencing in strawberry plants[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2015, 120(3): 1131-1138.
- [54] 温小红,姜永华,周轲,等. VIGS 诱导 *MdHB-1* 沉默对苹果果实成熟的影响[J]. *西北农业学报*, 2014, 24(11): 113-119.
WEN X H, JIANG Y H, ZHOU K, *et al.* Effects of virus-induced *MdHB-1* silencing on apple fruit ripening[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2014, 24(11): 113-119.
- [55] IGARASHI A, YAMAGATA K, SUGAI T, *et al.* Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes[J]. *Virology*, 2009, 386(2): 407-416.
- [56] 刘美,刘莉铭,吴会杰,等. VIGS 技术的研究进展及其在葫芦科作物中的应用[J]. *果树学报*, 2018, 35(11): 1422-1429.
LIU M, LIU L M, WU H J. The research of VIGS technique and the application in the Cucurbitaceae[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(11): 1422-1429.
- [57] 李建平,郝晓燕,李琴,等. 棉花 VIGS 病毒载体的构建及其在抗病基因功能鉴定的应用[J]. *新疆农业科学*, 2018, 55(7): 1203-1208.
LI J P, HAO X Y, LI Q, *et al.* Construction of VIGS virus carrier in cotton and its application in identification of disease-resistant gene function[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(7): 1203-1208.
- [58] 穆春,周琳,李茂营,等. 水培条件下病毒诱导棉花基因沉默体系的建立及优化[J]. *作物学报*, 2016, 42(6): 844-849.
MU C, ZHOU L, LI M Y, *et al.* Establishment and optimisation of virus-induced gene silencing in system hydroponic cotton[J]. *The Crop Journal*, 2016, 42(6): 844-849.
- [59] 唐宜,李凌飞,王小菁. 非洲菊花瓣瞬时表达和病毒诱导的基因沉默(VIGS)系统的建立[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(3): 505-512.
TANG Y, LI L F, WANG X J. Establishment of gene silencing (VIGS) system for instantaneous expression of petals and viral induction in African chrysanthemum[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(3): 505-512.
- [60] 李小龙,谢伶俐,焦靖芝,等. VIGS 技术在基因功能研究中的应用进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(6): 1401-1404.
LI X L, XIE L L, JIAO J Z, *et al.* The application progress of VIGS technology in gene function research[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(6): 1401-1404.
- [61] ELOMAA P, UIMARI A, MEHTO M, *et al.* Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1831-1842.
- [62] LAITINEN A E, AINASOJA M, BROHOLM S K, *et al.* Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(13): 3691-3703.
- [63] EKENGREN S K, LIU Y, SCHIFF M, *et al.* Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato[J]. *The Plant Journal*, 2003, 36(6): 905-917.
- [64] RYU C M, ANAND A, KANG L, *et al.* Agrodrench: A novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species[J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(2): 322-331.
- [65] 万如意,丛云寒,姜珊珊,等. VIGS 沉默 *CaCYC1* 基因对喜树叶片中喜树碱合成的影响[J/OL]. *分子植物育种*: 1-11 [2019-12-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20190313.2107.035.html>.
WAN R Y, CONG Y H, JIANG S S, *et al.* Effect of VIGS silencing *CaCYC1* gene on camptothecin synthesis in leaves of *Camptotheca acuminata* [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*: 1-11 [2019-12-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20190313.2107.035.html>.
- [66] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(2): 237-245.
- [67] LIU Y L, SCHIFF M, MARATHE R, *et al.* Tobacco *RARI*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for N mediated resistance to tobacco mosaic virus[J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(4): 415-429.
- [68] LIU Y L, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(6): 777-786.
- [69] TANG Y, WANG F, ZHAO J P, *et al.* Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 632-641.
- [70] FERNANDEZ-MORENO J P, ORZAEZ D, GRANELL A. VIGS: A tool to study fruit development in *Solanum lycopersicum*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 975: 183-196.