



病毒诱导基因沉默在蔬菜作物上应用的研究进展

李杰, 罗江宏, 杨萍[✉]

红河学院生命科学与技术学院/云南省高校滇南特色生物资源研究与利用重点实验室, 云南蒙自 661100

摘要: 近年来, 病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 技术作为一种研究植物基因功能的反向遗传学手段, 因其构建简易、成本低、周期短等优势在功能基因组领域的研究更为广泛和深入。在蔬菜作物生长发育、逆境胁迫、物质合成和代谢调控等相关基因功能的研究中, VIGS 作为一种快速、高效、高通量的基因沉默新技术发挥了重要作用。因此, 利用 VIGS 技术开展蔬菜作物新基因的挖掘、抗病抗逆基因功能鉴定、作物改良、分子育种等相关研究的意义重大。目前, 在蔬菜作物中已经成功建立了多种以病毒为载体的 VIGS 体系, 但该体系仍然存在一些不足。随着研究者对 VIGS 作用机制的深入探究和病毒载体的不断开发, VIGS 在蔬菜作物上的应用范围越来越广阔。本文通过梳理近年来国内外基于 VIGS 技术研究茄果类、瓜类和叶菜类等蔬菜基因功能的研究报道和发展趋势, 对 VIGS 技术机制、病毒载体的应用以及 VIGS 技术进展做了简要解析, 同时对比分析了 VIGS 技术与 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 以及当前较为流行的 CRISP/CAS9 技术的优缺点。重点介绍 VIGS 技术在蔬菜果实发育和抗病中的应用, 对该技术在蔬菜作物物质代谢、激素调控、生物与非生物胁迫应答方面的最新进展进行了综述, 并列出了利用 VIGS 技术研究茄果类、瓜类、叶菜类和豆类蔬菜靶基因功能和沉默表型的案例, 总结了 VIGS 技术在研究蔬菜作物基因功能时缺乏适合的 VIGS 载体, 缺乏有效的病毒载体侵染方法, 在某些组织中难以系统性沉默, 沉默效率低, VIGS 固有的局限性等方面存在的问题和不足。同时提出了未来 VIGS 技术在开发特异性与稳定性更高的病毒载体, 选择高效的基因片段, 建立适合更多寄主范围的病毒载体等方面的研究方向。对 VIGS 技术用于蔬菜基因功能分析、蔬菜作物改良、分子育种以及生产不携带外源基因的蔬菜品种育成等方面的应用前景进行了展望, 以期开展蔬菜作物生长发育、次生代谢、逆境胁迫等相关基因功能研究以及突破制约 VIGS 技术的关键因素研究提供思路与参考。

关键词: 基因沉默; VIGS 技术; 蔬菜; 基因功能

Research Advances of Applying Virus-Induced Gene Silencing in Vegetables

LI Jie, LUO JiangHong, YANG Ping[✉]

College of Life Science and Technology, Honghe University, Key Laboratory for Research and Utilization of Characteristic Biological Resources in Southern Yunnan, Mengzi 661100, Yunnan

Abstract: Recently, the virus-induced gene silencing (VIGS) as a reverse genetics tool is used for gene function analysis. Due to its advantages of simple construction, low cost and short cycle, VIGS technology has been extensively and deeply studied in the field of functional genomics. VIGS technology, as a fast, effective, high-throughout new technology, has played an important role in research of vegetable functional genes in plant development processes, disease resistance, stress resistance, biosynthesis and metabolic regulation. Herein, it is of great significance to excavate new genes and identify the function of disease resistance, stress resistance

收稿日期: 2020-07-31; 接受日期: 2020-12-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31760592)、红河学院科研基金博硕资助项目 (XJ17B07, XJ17B08)

联系方式: 李杰, Tel: 0873-3698630; E-mail: gsau23@126.com。通信作者杨萍, Tel: 0873-3698630; E-mail: gsau123@163.com

genes, crop improvement and molecular breeding by using VIGS technology. Many VIGS systems with virus as vector have been successfully established in vegetable crops, but they still have some shortcomings. With the in-depth exploration of the mechanism of VIGS and the continuous development of virus vectors, VIGS has been applied to a wider range of vegetable crops. This paper reviewed the current status and research progresses of gene function of eggplant, melons and leafy vegetables based on VIGS technology in recent years, and the mechanism of VIGS technology, the application of virus vector and the progress of VIGS technology was briefly analyzed. Meanwhile, the advantages and disadvantages of VIGS technology, RNA interference (RNAi) and current CRISP/CAS9 technology were compared and analyzed. It focused on the application of VIGS technology in vegetable fruit development and disease resistance, and the latest progresses of VIGS technology in vegetable crop metabolic regulation, hormone regulation, biotic and abiotic stress responses were summarized. The cases of studying target genes function and silencing phenotypes of solanaceous, melon, leafy and legume vegetables by VIGS were listed. Finally, the problems and deficiencies of VIGS technology in studying gene function of vegetable crops were summarized, such as lack of suitable VIGS vector, lack of effective virus vector infection method, difficulty in systematic silencing in some tissues, low silencing efficiency, inherent limitations of VIGS, etc. At the same time, the future research directions of VIGS technology in the development of virus vectors with higher specificity and stability, selection of efficient gene fragments, and establishment of virus vectors suitable for more host range were proposed. The application foreground of gene function analysis, improvement, molecular breeding of vegetable crops and production not carrying exogenous gene of vegetable varieties by VIGS technique was prospected. This review would provide a guidance and give ideas for future studies on the growth and development of vegetable crops, secondary metabolism and adversity stress related gene function research and breakthrough in the key factors restricting VIGS technique.

Key words: gene silencing; VIGS; vegetable; gene function

我国蔬菜产业经过几十年的发展,在产值、出口量等方面均位居农作物首位,已成为中国农民增收、加快农村发展的支柱产业,但仍然存在蔬菜品质弱、产量低等问题。目前急需挖掘与蔬菜作物重要农艺性状相关的基因以培育优异、抗病和具有特色的品种^[1-2]。随着高通量测序技术的发展,越来越多的蔬菜作物全基因组测序已完成,但对于单个基因的功能研究,还需要更有效和可靠的技术体系。基于植物病毒与其宿主在长期进化过程中形成的共生关系,将外源基因通过病毒载体导入植物体内,可为基因挖掘和基因功能研究提供技术支持^[3]。病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是利用 RNA 介导的植物天然抗病毒机制的一种技术,主要利用遗传免疫方式系统性沉默某一特定基因,再经过表型鉴定和基因表达来确定靶基因在植物生长发育中的作用及对环境变化产生的应激响应。用携带靶基因片段的病毒来侵染植物,植物的遗传免疫系统被激活后,植物体内与靶基因同源的 RNA 被特异性降解,从而发生基因沉默^[4]。与传统的转基因、基因敲除、反义抑制等基因功能研究方法相比,VIGS 技术试验周期短,不依赖转基因操作,具有低成本、高通量等优点^[5]。近年来,VIGS 技术的建立为蔬菜作物功能基因组学的研究提供了优越的条件,在基因功能的研究中得到了越来越广泛的应用,从而促进了我国蔬菜产业的可持续发展。

本文根据国内外相关研究的最新报道,重点对 VIGS 技术在蔬菜作物生长发育、次生代谢、生物与非生物胁迫等几个方面进行综述,分析 VIGS 技术存在的问题及解决方法,以期为 VIGS 技术的进一步应用提供依据。

1 VIGS 技术介绍

1.1 VIGS 技术机制

VIGS 是一种利用植物防御病毒入侵的自然机制来研究植物基因功能的基因转录抑制技术,属于 RNA 干扰的一种。利用携带植物目的基因片段的病毒载体,通过有效的病毒侵染方式侵染植物,病毒载体在寄主体内复制和表达时,在 RNA 聚合酶的作用下,产生双链 RNA(double strand RNA, dsRNA),dsRNA 在细胞中被特异性核酸内切酶切割产生 21—25 nt 的小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA),siRNA 能诱导与其具有同源性的植物内源基因 mRNA 降解,可结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。一方面,RISC 可以特异性地与细胞质中的同源 RNA 相互作用,使同源 RNA 降解,从而导致转录后基因沉默(PTGS)^[6];另一方面,RISC 特异性地与细胞核内的同源 DNA 相互作用,使其被甲基化等修饰,从而产生转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)^[7]。

1.2 VIGS 的病毒载体及应用

VIGS 是目前应用最广泛的研究植物功能基因的工具之一^[8]。根据已有的研究报道,有多种病毒载体(RNA 病毒、DNA 病毒、卫星病毒)在 VIGS 上成功应用,其中 RNA 病毒包括烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)、烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)、番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)、甘蓝缩叶病毒(cabbage leaf curl virus, CbLCV)等^[9]。但每种病毒载体诱导的沉默效率与宿主的选择有关。如 PVX 病毒载体在番茄上的研究发现,需要先进行体外转录才能进行 RNA 注射侵染^[10]。TRV 病毒载体的沉默效率高,沉默持续性长且病毒症状轻,因而被广泛用于 VIGS 载体的构建^[11]。苹果潜隐球形病毒(apple latent spherical virus, ALSV)因病症温和,且在番茄上不产生病毒症状,而经常用于番茄基因的沉默研究^[12]。DNA 病毒载体构建简单,试验操作难度低且无需体外转录。其中的甜菜曲顶头病毒(beet curly top virus, BCTV)和番茄卷曲叶病毒(tomato leaf curl virus, ToLCV)已成功用于番茄基因功能的研究^[13-14]。卫星病毒基因组小,在宿主中复制速度快且易于遗传。其中的中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCV)和烟草曲茎病毒(tobacco curly shoot virus, TbCSV)可高效用于番茄基因的沉默^[15-16]。研究者通过传统的“酶切-连接”方法成功构建了甜菜 WRKY 转录因子家族成员 *BvWRKY23* 的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)表达载体^[17]。

1.3 VIGS 技术进展

KUMAGAI 等^[18]首次以八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS) cDNA 片段完成 TMV-VIGS 载体构建。经过 3 年的发展, RUIZ 等^[19]利用 PDS 构建了 PVX-VIGS 载体。VALENTINE 等^[20]以 TRV 病毒为载体完成了 TRV-VIGS 体系的构建, TRV-VIGS 体系后来常用于蔬菜作物基因沉默载体的构建。近几年, WANG 等^[21]首次利用大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)建立了 BSMV-VIGS 体系用于大麦基因功能的研究。张怡等^[22]成功构建了大豆线虫肌钙蛋白(troponin C, tnc)和酰胺样多肽(FMRFamide-like peptides, flp)基因的 TRV-VIGS 体系。随着不同病毒载体 VIGS 体系研究的深入, PANDEY 等^[23]研究出复合病毒体系,将其他植物病毒的 miRNA 导入到另外一种病毒中,形成外源 mirRNAs

来侵染植株,开发了 MIR-VIGS 方法,标志着双病毒载体应用 VIGS 体系的产生。赵祯等^[24]运用 Gateway 技术成功构建了茄子(*Solanum aculeatissimum*) TRV-VIGS 表达载体,沉默了叶片和果实的 *SmMsrA*,表明基因克隆技术与 VIGS 技术的结合使用,减少了酶切环节,提高了载体构建的效率。最近,宋恬等^[25]首次在扁桃花器官上建立了以 TRV 为载体的 VIGS 沉默体系,成功用携带 pTRV2-*AcCBF1* 的农杆菌侵染扁桃花器官且出现沉默效果。邱润霜等^[26]以番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt orthotospovirus, TSWV) *N* 构建到 pTRV-PTV00 载体上,完成了 TSWV 介导的 *N* VIGS 载体的构建,开阔了构建病毒内源基因沉默体系的新思路。

2 VIGS 技术的优点

VIGS 研究基因功能的优点在于它构建简易、周期性短、成本较低。一般构建重组载体到侵染植物进行功能鉴定只需几周时间,因此可以大规模进行基因组序列和 EST 序列的功能鉴定^[27]。VIGS 对于难获突变体作物的研究优势突出。当植物基因组较大时,利用靶基因家族的保守 DNA 区域, VIGS 通过沉默一个基因家族的多个成员来避免功能冗余的问题,当涉及到大的蛋白质家族或基因重复时,各种点突变和插入不能产生适当的表型^[28],而 VIGS 可使序列差异为 10%—20%的同源基因沉默^[29]。利用 VIGS 沉默目标基因无需靶基因的完整编码序列,只需其中的一段 cDNA 片段即可实现靶基因沉默^[30]。而 RNAi 技术在应用时, dsRNA 的合成成本过高,不利于产品的推广^[31]。CRISPR/Cas9 技术实现基因编辑有赖于 PAM 序列,在附近无 PAM 序列的区域时无法进行编辑^[32]。VIGS 具备将 cDNA 文库整合到病毒载体上进行高通量基因筛选分析的优势^[33]。VIGS 技术可用于不同蔬菜物种间比较基因组学的研究^[34]。

3 VIGS 在茄果类蔬菜作物中的应用

蔬菜作物分子学研究领域已进入后基因组时代^[35]。应用 VIGS 技术鉴定茄果类蔬菜的基因功能涉及物质合成调控、生物和非生物应激反应等方面。根据国内外近 3 年的最新文献,重点介绍在茄果类蔬菜果实发育、激素调节和植物与病原微生物相互作用及非生物胁迫应答等方面利用 VIGS 技术的研究进展(表 1)。

表 1 利用 VIGS 研究的茄果类蔬菜基因及其表型

Table 1 List of genes silenced by VIGS and the phenotype observed in solanaceous vegetable

物种	靶基因	载体	功能	沉默表型	参考文献
Species	Target gene	Vector	Function	Silencing phenotype	Reference
番茄	<i>KAS III, KAS IV/II-like</i>	TRV	酰基糖代谢	直链脂肪酸减少	[36]
Tomato			Acyl glucose metabolism	Reduced straight-chain fatty acids	
番茄	<i>SISWEET1</i>	TRV	糖的转运	己糖含量降低	[37]
Tomato			Sugar transport	Decreased hexose	
辣椒	<i>CaMYB108</i>	TRV	辣椒素合成	花粉延迟开裂	[38]
Pepper			Capsaicin synthesis	Delayed pollen cracking	
辣椒	<i>pAMT</i>	ALSV	辣椒素合成	辣椒素含量降低	[39]
Pepper			Capsaicin synthesis	Capsaicin content decreased	
番茄	<i>SLAR</i>	TRV	类胡萝卜素合成	类胡萝卜素含量降低	[40]
Tomato			Carotenoids synthesis	Carotenoids content decreased	
茄子	<i>PDS, CHLI, CHLH</i>	TRV	镁螯合酶	叶片发黄	[41]
Eggplant			Magnesium chelataase	Foliage yellowing	
茄子	<i>CHS</i>	TRV	类黄酮的合成	果实颜色变浅，果实弯曲	[42]
Eggplant			Flavonoids synthesis	Changed fruit color and fruit curved	
番茄	<i>SIILL</i>	TRV	生长素合成	加速离层	[43]
Tomato			Auxin synthesis	Accelerate the abscission layer	
番茄	<i>LeCTR1</i>	TRV	乙烯合成	叶片弯曲减轻	[44]
Tomato			Ethylene synthesis	Reduced leaf curve	
番茄	<i>DEK</i>	TRV	抗病性	抗病性减弱	[45]
Tomato			Disease resistance	Attenuates disease resistance	
茄子	<i>SPDS</i>	TRV	抗枯萎病	抗病性减弱	[46]
			Resistant to wilt	Attenuates disease resistance	
辣椒	<i>CaPHL8</i>	TRV	青枯病	抗病性减弱	[47]
Pepper			Bacterial wilt	Attenuates disease resistance	
番茄	<i>SAHH1, MS1, GAD2</i>	TRV	青枯病	抗病性减弱	[48]
Tomato			Bacterial wilt	Attenuates disease resistance	
番茄	<i>ShORR-1</i>	TRV	白粉病	叶片病斑增多	[49]
Tomato			Powdery mildew	Leaf lesions increased	
辣椒	<i>CaWRKY45, CaWRKY58</i>	TRV	抗病和抗旱	抗性减弱	[50]
Pepper			Resistance to disease and drought	Attenuates disease resistance	
番茄	<i>ABC-C6, ABC-G33</i>	TRV	根系分泌	根结线虫减少	[51]
Tomato			The root secretion	Reduced nematodes	
茄子	<i>NBS-LRR</i>	TRV	根结线虫	抗病性减弱	[52]
Eggplant			Nematodes	Attenuates disease resistance	
辣椒	<i>CaWRKY27</i>	TRV	盐胁迫	抗性减弱	[53]
Pepper			Salt stress	Attenuates resistance	
番茄	<i>GSTU43</i>	TRV	抗低温性	抗性减弱	[54]
Tomato			Chilling resistance	Attenuates resistance	
辣椒	<i>CaDIF1, CaDIS1</i>	TRV	脱落酸和干旱胁迫	气孔增大，蒸腾增加	[55]
Pepper			ABA and drought stress	Stomata and transpiration increases	
番茄	<i>MYB80</i>	TRV	抗低温	抗低温减弱	[56]
Tomato			Chilling stress	Attenuates chilling resistance	

3.1 VIGS 在茄果类蔬菜物质合成调控中的研究应用

糖类的合成与转运在植物新陈代谢与物质循环中起着关键作用，同时也受到多方面的调控。利用 VIGS 技术，目前已经系统研究了茄果类蔬菜中糖类合成途径中的一些关键调控因子的功能。通过基因

编辑技术，研究基因表达的激活（activation）和抑制（repressor）^[57]。例如在番茄酰基糖代谢中间产物直链脂肪酸（straight-chain fatty acid, SCFA）合成途径 *KASII* 和 *KASIII* 功能的研究中，沉默该基因后，SCFA 含量减少了 40%，同时沉默植株中 *KASII* 和

KASIII 表达量显著降低^[36]。那么糖类是如何由新叶向老叶转运呢?最新的一项研究通过 VIGS 技术沉默 SWEET 家族基因 *SISWEET1a* 发现,沉默番茄植株的幼叶中已糖积累量减少了 50%,在成熟叶片中增加了 2 倍多,证明 *SISWEET1a* 在番茄叶片合成的糖分向幼叶转运的过程中起着关键作用,挖掘出了 *SISWEET1a* 一个新的功能^[37],说明基因编辑技术能对家族基因中单个基因准确定位,并进行稳定改造,挖掘其基因功能^[58]。

辣椒素是辣椒果实风味品质的重要指标,并且在生长中起着防虫防病的自我防御作用。茉莉酸(jasmonic acids, JAs)在调控辣椒素的代谢信号转导中起着非常重要的作用,其调控因子 R2R3-MYB 的转录因子 *CaMYB108* 主要在辣椒的果实和花中表达,但是 *CaMYB108* 的下游信号尚未确定。利用 VIGS 技术沉默 *CaMYB108* 后发现辣椒素生物合成基因 *CBGs* 表达量降低,辣椒素含量减少,花药开裂延迟,同时花粉活力降低。通过双荧光素酶报告基因检测发现, *CaMYB108* 靶向启动 *CBG*。另外,茉莉酸甲酯诱导了 *CaMYB108* 和 *CBGs* 的表达,从而证实了 *CaMYB108* 参与辣椒植株雄蕊的发育以及辣椒素的合成^[38]。以上研究都是基于 TRV 载体诱导的 VIGS 方法,而另外一种 ALSV 载体侵染植株后虽然没有明显的外观特征,但其部分基因序列经过改造后也常用于 VIGS 体系的构建。有研究者发现,利用 ALSV 病毒侵染的藜麦叶片摩擦接种到辣椒上的方式并不能实现侵染,但使用 ALSV 病毒浓缩液则侵染成功,且沉默效率达到 90%。在 ALSV 介导的 VIGS 体系中,将氨基酸转移酶基因(*pAMT*)导入 ALSV 病毒载体的方式成功侵染了辣椒植株,且侵染率在 80%—90%,*pAMT* 沉默植株的辣椒素含量和辣椒素酯的积累减少。以上研究结果表明,ALSV 病毒能够用于构建 VIGS 体系来研究辣椒素积累的调控机制,从而可以在辣椒育种上通过基因改造来提高辣椒素的含量^[39]。

番茄果实中类胡萝卜素的积累受环境和激素的影响较大,在调控番茄果实类胡萝卜素代谢中,螺旋-环-螺旋转录因子(Helix-Loop-Helix, SLAR)影响类胡萝卜素的合成。为了挖掘 *SLAR* 的功能,研究者利用 VIGS 技术沉默普通番茄‘M82’和樱桃番茄‘Micro Tom’的 *SLAR*,发现两个品种具有相同的表型,而且沉默后番茄红素、总类胡萝卜素和叶绿素含量明显减少,验证了 *SLAR* 直接参与番茄类胡萝卜素的生物合成过程^[40]。有研究者利用 CRISPR/Cas9 技术分别以八氢番茄红素合成酶 1(phytoene synthase 1, *PSY1*)、

MYB12 和花色苷 2 (Anthocyanin 2, *ANT2*) 为靶位点,成功培育出黄色、粉红色和紫色番茄^[59],但构建载体时需要准确的靶基因序列,且容易脱靶。糖苷生物碱属于有毒物质,存在于许多茄科植物中,其合成受遗传和环境的影响,尤其是光环境。叶绿素和类胡萝卜素的生物合成也依赖光信号转导途径,同时在糖苷生物碱合成过程中具有相同的中间物质。研究者通过 VIGS 沉默 *PDS* 和镁螯合酶基因 *CHLI* 与 *CHLH*,发现沉默茄子叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量明显降低,通过高效液相色谱和代谢物全谱分析,发现沉默植株糖苷生物碱含量显著降低,参与糖苷生物碱合成和其他代谢物合成的基因下调表达,而且发现光合色素的积累会影响茄族类糖苷生物碱在茄子叶片中的合成^[41]。在茄子果实成熟过程中,查尔酮、花青素等类黄酮物质在其角质层和表皮细胞中有所积累,类黄酮在茄子果实成熟过程中的调控机制和影响因素也利用 VIGS 技术得到了解答。研究者利用 VIGS 技术沉默茄子查尔酮合成酶基因(*SmCHS*),发现沉默植株茄子果实颜色变浅,花青素含量降低,表皮细胞的大小和形状都发生了变化,且沉默植株茄子果实的向重力性反应减轻,茄子果实弯曲,这一表型不仅说明 *CHS* 调控茄子果实中类黄酮的积累,还证明了表皮细胞的延展性依赖 *CHS* 进行表达,从而揭示了 *CHS* 的新功能^[42]。许志茹等^[60]利用 GATEWAY 技术构建了芜菁(*Brassica rapa*)二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, *DFR*)基因过表达的 RNAi 载体,为鉴定 *DFR* 在依光型和非依光型花青素合成过程中的功能研究奠定了基础。同样是色素相关基因功能的研究, VIGS 体系不需要构建植物遗传转化体系,大大缩短了研究进程。生长素作为植物适应环境变化和植物组织代谢的关键激素,其在植物离层区域如何调控植物组织离层尚不清楚。相关研究者对此展开了研究,在对番茄生长素共轭水解酶相关的 5 个基因功能的研究中发现, *IAA-Ile* 参与生长素共轭水解过程,并作为候选基因存在于离层区。利用环己酰亚胺(cycloheximide, CHX)处理发现从头合成生长素共轭水解酶抑制组织离层。利用 VIGS 技术沉默番茄 *SHLL1*、*SHLL3*、*SHLL5*、*SHLL6* 和 *SHLL7*,发现沉默目标基因不会影响其他 *SHLL* 的表达。同时发现离层区生长素能够在花药离层中发挥作用,是因为受到其浓度的影响,且 *SHLR1*、*SHLL5* 和 *SHLL6* 存在协同作用,而外源使用生长素后植株沉默表型明显减弱^[43]。

3.2 VIGS 在茄果类蔬菜生物胁迫应答机制中的应用

番茄卷叶病毒 (tomato leaf curl virus, ToLCV) 感染番茄后诱导了乙烯反向调控途径信号基因 *LeCTR1* 的表达。利用 VIGS 技术构建番茄 *LeCTR1* 沉默植株, 发现沉默植株对 ToLCV 病毒的抗性增加, 卷叶症状减轻, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累显著减少, 主要抗病相关基因 (*NPR1*、*PR1*、*PR5*、*AOS2*、*EIN2*、*EIN3* 和 *ERF5*) 表达增加, 说明沉默 *LeCTR1* 可以增强番茄对卷叶病的抗性^[44]。DEKs 参与植物细胞的增殖、分化、衰老和死亡。利用 VIGS 技术沉默番茄 *DEK* 后, 番茄对葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000, Pst DC3000) 的抗病性降低, 沉默番茄植株中 ROS 积累增加, 而且下调了抗病基因的表达, 从而证明了 DEKs 参与番茄抗病的基因功能^[45]。细菌性枯萎病是由青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的, 而其在茄子上的致病机理一直不清楚。研究者利用 VIGS 技术来探究亚精胺合成酶 (spermidine synthase, SPDS) 在茄子青枯病中的作用机理, 发现接种青枯病菌后茄子 SPDS 被诱导表达, 亚精胺 (Spd) 含量增加, 尤其是在耐性系植株中更加明显, 推断 Spd 在茄子抗青枯病中有着重要的作用。之后又通过酵母单杂和荧光素酶报告基因试验来验证这一推论, 发现 R2R3-MYB 转录因子 *SmMYB44* 确实可以和 SPDS 启动子直接结合而诱导基因表达, 进一步通过超表达 *SmMYB44* 茄子植株证明了抗青枯病的 *SmMYB44-SmSPDS-Spd* 机制^[46]。在辣椒上也利用 VIGS 技术证明了青枯病的防御机制, 研究发现 MYB 转录因子 *CaPHL8* 参与辣椒青枯病的防御, 通过氨基酸序列分析表明 *PHL8* 为 MYB 转录因子, 接种病菌植株的 *CaPHL8* 上调表达, 而且 GUS 活性检测也证明了这一结论。通过 VIGS 技术证明了 *CaPHL8* 在辣椒抗青枯病中的作用, 而且这个基因在高温高湿条件下也不会诱导表达^[47]。在番茄青枯病的研究中, 利用 VIGS 技术沉默 MTC 关联基因 *SAMS2*、*SAHH1* 和 *MSI* 以及 GABA 生物合成相关基因 *GAD2* 和 *SSADH1*, 发现高浓度和中浓度侵染的 *SAHH1*、*MSI* 和 *GAD2* 沉默番茄对青枯病的抗性减弱, 从而验证了 MTC 和 GABA 生物合成在番茄青枯病中的致病作用^[48]。在探索粉孢菌 (*Oidium neolycopersici*) 引起番茄白粉病的研究中, 利用 VIGS 技术构建了 *ShORR-1* (solanum habrochaites oidium resistance required-1) 沉默株系, 证明 *ShORR-1*

在番茄抗白粉病中的基因功能^[49]。辣椒 *CaWRKY45* 参与抗病的功能也利用 VIGS 技术得以验证^[50]。

植物根系分泌物和根结线虫均会引起土壤性状的改变, 根结线虫也会侵染植物根系。在最新的一项关于植物、土壤和根结线虫的报道中, 研究者利用 VIGS 技术沉默番茄根系 ABC 转运蛋白基因 *ABC-C6* 和 *ABC-G33*, 其中 *ABC-C6* 沉默植株抑制结瘤线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和黄金线虫 (*Globodera* spp.) 产卵, *ABC-G33* 沉默株系只抑制黄金线虫产卵。*ABC-C6* 沉默植株对土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 没有抑制作用, 但 *ABC-G33* 沉默植株对枯草芽孢杆菌具有抑制作用, 发现 *ABC-C6* 在生物防治根结线虫上的重要作用, 从而证明了 ABC 转运蛋白基因在土壤根系分泌物和线虫之间的关系, 为保护植物免受线虫侵染提供了依据^[51]。在茄子上的研究发现, 核苷酸结合位点富含亮氨酸的重复序列 nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) 抗逆基因 *SacMi*, 在接种线虫的植株中该基因表达量上调, 沉默 *SacMi* 植株表现出对线虫的敏感性^[52]。

3.3 VIGS 在茄果类蔬菜非生物胁迫应答机制中的应用

CaWRKY27 能够正调控辣椒植株对细菌性青枯病的抗性, 同时负调控植株的耐热性。研究者利用 VIGS 技术沉默 *CaWRKY27*, 发现沉默的辣椒植株对盐胁迫和渗透胁迫抗性显著增强, 还发现 *CaWRKY27* 不仅在辣椒逆境胁迫中是转录激活因子, 而且还能编码抗逆境阻遏蛋白^[53]。谷胱甘肽转移酶基因 (*GSTU43*) 参与了 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, ALA) 诱导的抗氧化胁迫, 并调节低温胁迫下叶绿素的合成。利用 VIGS 技术沉默 *GSTU43* 后, 发现沉默植株中谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、抗坏血酸氧化酶和谷胱甘肽还原酶活性降低, 膜脂过氧化物含量增加, 而外源 ALA 处理后这些指标均恢复, 说明 ALA 可引起由 *GSTU43* 编码的 GST 增加, 从而增强番茄对低温引起的氧化胁迫抗性^[54]。研究人员在番茄中利用 CRISPR/Cas9 系统构建 CRISPR-*BZR1* 突变体, 证实 *BZR1* 还通过调节细胞膜受体蛋白激酶 FERONIA 基因 (*FER*) 参与番茄的耐热性^[61], 但整个番茄植株材料均在 *bzr1* 突变体的基础上才能完成。

F-box 蛋白、*CaDIF1* (辣椒干旱诱导 F-box protein1 基因) 可以由 ABA、干旱胁迫、H₂O₂ 和 NaCl 胁迫诱

导表达, *CaDIF1* 沉默株系展现出干旱敏感性, 而超表达株系展现出 ABA 敏感性和干旱耐性。利用酵母双杂交试验确定了 *CaDIS1* (辣椒 DIF1-Interacting SKP1)在细胞质和细胞核中与 *CaDIF1* 存在互作现象。*CaDIF1* 和 *CaDIS1* 沉默株系表现出对 ABA 不敏感以及干旱耐性降低, 且两种植株叶片气孔变大和蒸腾速率增加, 进一步说明 *CaDIF1* 和 *CaDIS1* 可互作, 并且参与依赖 ABA 信号转导的干旱胁迫抗性过程^[55]。研究者也利用 VIGS 技术揭示了 *MYB80* 参与调控辣椒低温胁迫的机制, 发现低温处理下 *MYB80* 沉默植株抗冷性减弱^[56]。

4 VIGS 在瓜类、叶菜类和豆类蔬菜作物中的应用

表 2 列举了利用 VIGS 技术沉默瓜类、叶菜类和豆类蔬菜相关功能基因及沉默后的表型。瓜类蔬菜有黄瓜、西葫芦、丝瓜、香瓜和西瓜等, VIGS 试验一般使用 ALSV 病毒作为载体侵染葫芦科作物^[69]。克隆黄瓜叶片 *PDS* 和 *SU* (300 bp), 分别构建 ALSV-*PDS* 和 ALSV-*SU* 两个载体侵染葫芦科植物的子叶, 沉默植株分别表现出光漂白和黄叶表型, 说明导入 ALSV-*PDS* 和 ALSV-*SU* 载体的植物内源 *PDS* 和 *SU* 被沉默, 表明 ALSV 介导的 VIGS 体系成功构建^[28]。研究者还利用 TRV 介导的 VIGS 技术构建黄瓜 glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase 6 (*GPAT6*) 基因沉默体系, 探究 *GPAT6* 在黄瓜自毒胁迫中的功能,

沉默植株表现出对自毒物质肉桂酸的抗性增强^[62]。在甜瓜 (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino) *CmLOX10* 功能验证中, 沉默植株 *CmLOX10* 表达量下调, pTRV-*CmPDS* 沉默植株叶片出现白化现象, 绿色荧光蛋白 (GFP) 检测的结果进一步确认了沉默现象, 证明 TRV 病毒诱导的基因沉默体系在甜瓜上构建成功^[63]。

芜菁黄化花叶病毒 (turnip yellow mosaic virus, TYMV) 具有正义 RNA 链, 可以侵染许多十字花科植物。例如以白菜 (*B. rapa* ssp. *pekinensis* cv. Bre) *BcPDS* 和 *BcNRT1* 为靶基因, 从 *BcPDS* 和 *BcNRT1* 中选取合适的 40 bp 序列, 反向互补处理后用 T4 连接酶进行连接, 分别构建 pTY-*BcPDS* 和 pTY-*BcNRT1* 载体。白菜植株被 pTY-*BcPDS* 侵染可导致白菜中该基因的表达显著降低, 沉默效果比较明显; pTY-*BcNRT1* 侵染白菜植株, 显著抑制了 *BcNRT1* 在转录水平的表达^[29]。最近的一项关于白菜包心紧实度受转录辅激活因子 ANGUSTIFOLIA3 (AN3) 的研究中, 也利用 TYMV-VIGS 技术, 发现基因沉默的白菜在莲座期和团棵期 *AN3* 都下调表达, 证明基因沉默刺激了白菜叶片包心的形成^[66]。

在菠菜雌花发育机制的研究中, 通过甜菜曲顶病毒 (beet curly top virus, BCTV) 诱导的 VIGS 体系, 对 DELLA 家族转录因子 *SpGAI* 在 GA 参与雌花形成中的基因功能得到了验证。沉默 *SpGAI* 后雌花表现出雄花器官的表型特征, 中度表型是发育一个雄蕊代替雌蕊, 但仍产生两个萼片; 重度表型是发育 4 个萼片、

表 2 利用 VIGS 研究的瓜类、叶菜类和豆类蔬菜基因及其表型

Table 2 List of genes silenced by VIGS and the phenotype observed in melon, leaf and legume vegetable

物种	靶基因	载体	功能	沉默表型	参考文献
Species	Target gene	Vector	Function	Silencing phenotype	Reference
黄瓜	<i>GPAT6</i>	TRV	不饱和脂肪酸的合成	抗性增强	[62]
Cucumber			Unsaturated fatty acids synthesis	Enhanced resistance	
甜瓜	<i>LOX10</i>	TRV	脂氧合酶合成	细胞程序性死亡	[63]
Muskmelon			Lipoxygenase synthesis	Programmed cell death	
菠菜	<i>GAL</i>	BCTV	调控开花	雌花结构改变	[64]
Spinach			Regulation flowering	Changed female flower	
叶用莴苣	<i>Hsp70</i>	TRV	耐热性	茎伸长	[65]
Leaf lettuce			Thermotolerance	Stem elongation	
白菜	<i>BrAN3</i> , <i>BrBRM</i>	TYMV	细胞伸长	叶片卷曲, 小叶增多	[66]
Chinese Cabbage			Cell elongation	Leaf curled and increased	
豌豆	<i>CHLI</i>	PEBV	叶绿素的合成	叶片发黄	[67]
Pea			Chlorophyll synthesis	Leaf yellowing	
豌豆	<i>PsPIP2</i>	PEBV	水通道蛋白合成	叶片和根系衰退	[68]
Pea			Aquaporin synthesis	Organ declines of leaf and root	

1 个雌蕊和 1 个雄蕊, 同时花有 4 个萼片, 类似于藜科植物中的完全花。沉默 *SpGAI* 后雄花发育成野生型雄花, 但对外观表型没有影响^[64]。MA 等^[70]以甘蓝 *BoPDS* 为靶基因, 利用 CRISPR/Cas9 系统实现甘蓝基因组的精准编辑, 主要是依赖单链向导 RNA 表达基因为完成突变体的构建, 与 VIGS 技术相比, 构建程序复杂, 且目标基因在核苷酸预期位置容易缺失。在研究叶用莴苣热胁迫下 *Hsp70* 表达量和形态变化时, 研究者构建 pTRV-*LsHsp70-2711* 沉默体系, 发现未进行胁迫处理的沉默植株 *LsHsp70-2711* 表达量下降, 茎明显伸长, 热胁迫和干旱处理后的沉默植株 *LsHsp70-2711* 表达量显著低于对照植株, 且高温胁迫对 *sHsp70-2711* 的影响大于干旱胁迫^[65]。

CONSTANTIN 等^[71]利用豌豆早枯病毒 (pea early browning virus, PEBV) 研发了一套有效的 VIGS 体系, 使得在豌豆中利用反向遗传学方法研究基因功能成为可能。在研究 ROS、Ca²⁺ 参与豌豆叶绿素合成的研究中, 利用 VIGS 技术构建了叶绿素合成关键基因 *CHLI* 沉默体系, 采用组织化学和荧光染色试验发现沉默豌豆植株中 ROS 和胞间游离 Ca²⁺ 增多, 且豌豆发黄叶片中产生超氧阴离子和过氧化氢^[67]。研究者还利用 VIGS 技术沉默了豌豆质膜水通道蛋白基因 *PsPIP2;1*, 发现沉默植株的叶片和根系中 *PsPIP2;1* 下调表达, 从而证明豌豆叶片和根系水分运输中 *PsPIP2;1* 对水通道蛋白具有调节作用^[68]。ZHANG 等^[72]利用菜豆荚斑驳病毒 (bean pod mottle virus, BPMV) 在大豆上成功建立了 VIGS 体系, 且该病毒载体能够应用于大豆、菜豆等豆类蔬菜上, 改造后拓展了 BPMV 病毒的宿主范围。

5 VIGS 技术的不足之处和研究展望

尽管 VIGS 技术自被开发以来, 已在许多蔬菜作物的基因功能鉴定研究中发挥了重要作用, 同时建立了多种有效的 VIGS 载体, 但是还存在一定的局限性。首先, 沉默茄果类蔬菜后植株的沉默表型不均一、表型难以辨识, 如在沉默番茄、辣椒等果实颜色相关基因时, 表现出沉默植株表型不均一; 再比如, 利用 ALSV 病毒侵染的藜麦叶片摩擦接种到辣椒上并不能成功侵染, 沉默植株表型不均一, 但使用 ALSV 病毒浓缩液则侵染成功, 且沉默效率达到 90%。其次, VIGS 技术存在靶基因沉默不完全、功能敲除不彻底、脱靶沉默和干扰症状等现象, 如同时沉默番茄的两个基因 *SIEBF* 和 *SIEBF2* 后发现植株表现出败育和生长缓慢

等一系列表型, 影响了 2 个基因功能的研究; 再者, 这种瞬时沉默技术的稳定性和持续时间较差, 且无法稳定遗传。另外, 基因家族功能冗余情况也会因缺乏某一特定家族成员基因完整序列而导致干扰; 此外, 环境因素如温度、湿度和光照等可影响病毒在宿主植物中的扩散速度, 其中温度对病毒粒子的扩散起主要作用。如 TRV 病毒侵染番茄时, 较好的沉默表型在 22℃ 或者更低的温度下才能发生。应用 VIGS 技术的困扰因素还有农杆菌的保存期短、农杆菌活性以及扩繁效率低, 因此, 建立并优化农杆菌扩繁发酵技术与工艺也是今后努力的方向^[73]。VIGS 载体种类仍然有限, 因此限制了 VIGS 技术的广泛应用^[74]。

VIGS 自被开发以来, 已经开始应用于蔬菜作物病毒病的预防和控制、杂草的防控和蔬菜作物重要生长阶段的调控等领域, 改变了传统的化学农药防治方法。例如, NEENA 等^[75]使用一种纳米材料 BioClay 装载 dsRNA 并沉默同源 RNA, 以控制烟草病毒病的传播。目前, 一些农业化工企业已经开始研发相关技术和产品^[76]。未来会有相关产品取代传统的化学农药^[77]。在优化 VIGS 技术方面, 为避免脱靶现象, 可利用不同种类的核酸数据库和在线软件精确设计靶基因序列, 以提高靶基因沉默的准确度。此外, 病毒载体可从 RNA 病毒、DNA 病毒载体、卫星病毒等多种载体中选择适用于不同种类蔬菜作物的沉默载体。今后随着 VIGS 技术的不断发展, 主要研究的方向可从以下几个方面进行研究: 一是开发特异性与稳定性更高的病毒载体; 二是优化病毒侵染后植株的培养条件, 如光照、温度等方面进行系统研究, 提高基因沉默的稳定性; 三是果菜类蔬菜果实离体 VIGS 技术的研发, 以便用于果实采后保鲜; 四是提高 VIGS 诱导基因沉默的持续时间, 从而实现在蔬菜长季节栽培过程中生长发育调控基因功能的研究; 五是选择高效的基因片段进行沉默, 以提高基因沉默的准确性。最后是病毒载体的安全性问题, 病毒是作物的重要病原物, 且大多数植物病毒都能以昆虫为媒介进行传播。所以, 在构建 VIGS 病毒载体时应应对病毒载体进行修饰, 使其不引起严重症状或被介体传播, 试验结束后对试验材料进行合理规范处理以免造成病毒传播。

RNAi 能够特异性地降低或关闭靶基因表达, 是基因功能研究的重要手段, 但很难控制靶基因的沉默效率, 且需要很长一段时间来建立遗传转化体系, 大大增加了科研工作者的时间成本, 降低了研究效率^[78]。CRISPR/Cas9 技术虽然具有一次编辑多个基因

的功能优势, 但存在脱靶效应, 且对于多倍体植物而言, 基因组改造的难度很大^[79-80]。VIGS 技术在选择目的基因靶位序列时, 对插入片段的方向并无要求, 且不易脱靶^[81-82]。因此, 随着高通量测序等新技术的不断研发和 VIGS 技术的优化, 基于非编码的单链小分子 RNA 构建的 VIGS 技术, 可以用于农作物新品种目标基因的高通量快速筛选, 促进了蔬菜基因工程和蔬菜作物改良以及分子育种的发展, 推进生产不携带外源基因的蔬菜品种育成的进程^[83]。相信 VIGS 作为高效的研究基因功能的技术在蔬菜作物上的应用必将被逐步完善, 在蔬菜功能基因组学研究的应用前景会更加广泛。

参考文献 References

- [1] 方智远. 中国蔬菜育种科学技术的发展与展望. 农学学报, 2018, 8(1): 21-27.
FANG Z Y. Development progress and future perspectives of vegetable breeding sciences and technologies in China. Journal of Agriculture, 2018, 8(1): 21-27. (in Chinese)
- [2] 黄季焜, 王济民, 解伟, 王晓兵, 侯玲玲, 周慧, 盛誉, 刘旭. 现代农业转型发展与食品安全供求趋势研究. 中国工程科学, 2019, 21(5): 1-9.
HUANG J K, WANG J M, XIE W, WANG X B, HOU L L, ZHOU H, SHENG Y, LIU X. Modern agricultural transformation and trend of food supply and demand in China. Engineering Science, 2019, 21(5): 1-9. (in Chinese)
- [3] 倪晓鹏, 高志红. 园艺作物基因组测序研究进展. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 9-13.
NI X P, GAO Z H. Research progress on genome sequencing of horticultural crops. Jiangsu Agricultural Science, 2016, 44(2): 9-13. (in Chinese)
- [4] 宋震, 李中安, 周常勇. 病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 研究进展. 园艺学报, 2014, 41(09): 1885-1894.
SONG Z, LI Z A, ZHOU C Y. Research advances of virus-induced gene silencing (VIGS). Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(9): 1885-1894. (in Chinese)
- [5] BECKER A, LANGE M. VIGS-genomics goes functional. Trends in Plant Science, 2010, 15(1): 1-4.
- [6] BRODERSEN P, SAKVARELIDZE-ACHARD L, BRUUN-RASMUSSEN M, DUNOYER P, YAMAMOTO Y Y, SIEBURTH L, VOINNET O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. Science, 2008, 320(5880): 1185-1190.
- [7] LLAVE C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. Trends in Plant Science, 2010, 15(12): 701-707.
- [8] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. Trends in Plant Science, 2011, 16(12): 656-665.
- [9] BURCH-SMITH T M, ANDERSON J C, MARTIN G B, DINESH-KUMAR S P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. Plant Journal, 2004, 39(5): 734-746.
- [10] MANNING K, TÖR M, POOLE M, HONG Y, THOMPSON A J, KING G J, GIOVANNONI J J, SEYMOUR G B. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nature Genetics, 2006, 38(8): 948-952.
- [11] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(7): 797-806.
- [12] IGARASHI A, YAMAGATA K, SUGAI T, TAKAHASHI Y, SUGAWARA E, TAMURA A, YAEHASHI H, YAMAGISHI N, TAKAHASHI T, ISOGAI M, TAKAHASHI H, YOSHIKAWA N. Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. Virology, 2009, 386(2): 407-416.
- [13] GOLENBERG E M, SATHER D N, HANCOCK L C, BUCKLEY K J, VILLAFRANCO N M, BISARO D M. Development of a gene silencing DNA vector derived from a broad host range geminivirus. Plant Methods, 2009, 5: 9.
- [14] PANDEY P, CHOUDHURY N R, MUKHERJEE S K. A geminiviral amplicon VA derived from tomato leaf curl virus ToLCV can replicate in a wide variety of plant species and also acts as a VIGS vector. Virology Journal, 2009, 6: 152.
- [15] CAI X Z, WANG C C, XU Y P, XU Q F, ZHENG Z, ZHOU X P. Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. Virus Research, 2007, 125(2): 169-175.
- [16] HUANG C J, XIE Y, ZHOU X P. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(3): 254-265.
- [17] 李国龙, 吴海霞, 孙亚卿. 甜菜 *BvWRKY23* 基因的 RNAi 载体构建. 作物杂志, 2020(5): 41-47.
LI G L, WU H X, SUN Y Q. Construction of RNAi expression vector of *BvWRKY23* gene in sugar beet. Crops, 2020(5): 41-47. (in Chinese)

- [18] KUMAGAI M, DONSON J, DELLA-CIOPPA G, HARVEY D, HANLEY K, GRILL L K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(5): 1679-1683.
- [19] RUIZ M T, VOINNET O, BAULCOMBE D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell Online*, 1998, 10(6): 937-946.
- [20] VALENTINE T, SHAW J, BLOK V C, PHILLIPS M S, OPARKA K J, LACOMME C. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 3999-4009.
- [21] WANG X Y, CAO A Z, YU C M, WANG D W, WANG X E, CHEN P D. Establishment of an effective virus induced gene silencing system with BSMV in *Haynaldia villosa*. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(2): 967-972.
- [22] 张怡, 阮九霄, 马晓萌, 傅露露, 乔月娥, 段素娟, 孟娉, 李成伟. 大豆胞囊线虫 VIGS 载体的构建与鉴定. *华北农学报*, 2012, 27(3): 223-226.
- ZHANG Y, RUAN J X, MA X M, FU L L, QIAO Y E, DUAN S J, MENG P, LI C W. Identification and construction of the recombinant vector of virus induced gene silencing of soybean heterodera glycines ichinohe. *Acta Agricultural Boreali-Sinica*, 2012, 27(3): 223-226. (in Chinese)
- [23] PANDEY P, SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. Advances in plant gene silencing methods. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1287(3): 3-23.
- [24] 赵祯, 刘富中, 张映, 齐东霞, 陈钰辉, 连勇. 茄子 *SmMsrA* 基因 VIGS 表达载体的构建及表达分析. *园艺学报*, 2015, 42(8): 1495-1504.
- ZHAO Z, LIU F Z, ZHANG Y, QI D X, CHEN Y H, LIAN Y. VIGS expression vector construction and expression analyses of *SmMsrA* gene in eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(8): 1495-1504. (in Chinese)
- [25] 宋恬, 田嘉, 李鹏, 刘梦婕, 张琦, 郭长奎, 李疆. 扁桃 AcCBF1 基因 VIGS 载体构建与功能分析. *果树学报*, 2019, 36(4): 421-429.
- SONG T, TIAN J, LI P, LIU M J, ZHANG Q, GUO C K, LI J. Vector construction and functional analysis of AcCBF1 using VIGS method in almond flower organs. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(4): 421-429. (in Chinese)
- [26] 邱润霜, 赵立华, 张晓明, 崔玥, 张洁, 郑雪, 李靖, 张仲凯. 番茄斑萎病毒 *N* 基因的 VIGS 载体构建. *植物病理学报*, 2020, 50(6): 1-12.
- QIU R S, ZHAO L H, ZHANG X M, CUI Y, ZHANG J, ZHENG X, LI J, ZHANG Z K. Construction of a VIGS vector containing *N* gene derived from tomato spotted wilt orthospovirus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(6): 1-12. (in Chinese)
- [27] 杨同文, 武安泉, 盛东峰, 李成伟. 病毒诱导的基因沉默在番茄功能基因组学研究中的应用进展. *园艺学报*, 2014, 41(3): 564-576.
- YANG T W, WU A Q, SHENG D F, LI C W. Applications of virus-induced gene silencing in studies on tomato functional genomics. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(3): 564-576. (in Chinese)
- [28] 刘美, 刘莉铭, 吴会杰, 古勤生. VIGS 技术的研究进展及其在葫芦科作物中的应用. *果树学报*, 2018, 35(11): 1422-1429.
- LIU M, LI L M, WU H J, GU Q S. Research progress in VIGS technology and its application in *Cucurbitaceae* crops. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(11): 1422-1429. (in Chinese)
- [29] 郑璐平, 谢荔岩, 林奇英, 谢联辉. 病毒诱导基因沉默的研究进展. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2008, 37(6): 636-640.
- ZHENG L P, XIE L Y, LIN Q Y, XIE L H. Advance in virus-induced gene silencing. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2008, 37(6): 636-640. (in Chinese)
- [30] TUTTLE J R, HAIGLER C H, ROBERTSON D. Method: Low-cost delivery of the cotton leaf crumple virus-induced gene silencing system. *Plant Methods*, 2012, 8(1): 27.
- [31] 王晓迪, 冀顺霞, 申晓娜, 刘万学, 万方浩, 张桂芬, 吕志创. 纳米载导 RNAi 技术在害虫防治中的研究和应用. *中国生物防治学报*, 2020: 1-20.
- WANG X D, JI S X, SHEN X N, LIU W X, WAN F H, ZHANG G F, LÜ Z C. Research and application of nanoparticle-mediated RNAi technology in pest control. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 1-20. (in Chinese)
- [32] 武林琳, 竹梦婕, 王咪, 李晓萍, 刘跃鹏, 裴蕾, 杨淑巧, 许琦, 王华, 郭文治. CRISPR/Cas9 技术在农作物中应用的局限及改进. *现代农业科技*, 2020(22): 26-29.
- WU L L, ZHU M J, WANG M, LI X P, LIU Y P, PEI L, YANG S Q, XU Q, WANG H, GUO W Z. The limitation and improvement of CRISPR/Cas9 technology in crops application. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(22): 26-29. (in Chinese)
- [33] RAMEGOWDA V, SENTHIL-KUMAR M, UDAYAKUMAR M, MYSORE K S. A high-throughput virus-induced gene silencing protocol identifies genes involved in multi-stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(1): 193-210.
- [34] ZHAO J P, WANG G Y, JIANG H L, LIU T L, DONG J G, WANG Z H, ZHANG B L, SONG J Q. Virus-based microRNA silencing in plants. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2172: 243-257.
- [35] CONG L, RAN F A, COX D, LIN S L, BARRETTO R, HABIB N,

- HSU P D, WU X B, JIANG W Y, MARRAFFINI L A, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [36] MANDAL S, JI W M, MCKNIGHT T D. Candidate gene networks for acylsugar metabolism and plant defense in wild tomato *Solanum pennellii*. *The Plant Cell*, 2020, 32(1): 81-99.
- [37] HO L H, KLEMENS PATRICK A W, NEUHAUS H E, KO H Y, HSIEH S Y, GUO W J. *SISWEET1a* is involved in glucose import to young leaves in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(12): 3241-3254.
- [38] SUN B M, ZHU Z S, CHEN CH J, CHEN G J, CAO B H, CHEN C M, LEI J J. Jasmonate-inducible R2R3-MYB transcription factor regulates capsaicinoid biosynthesis and stamen development in *Capsicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(39): 10891-10903.
- [39] LI C J, HIRANO H, KASAJIMA I, YAMAGISHI N, YOSHIKAWA N. Virus-induced gene silencing in chili pepper by apple latent spherical virus vector. *Journal of Virological Methods*, 2019, 273: 113711.
- [40] D'AMELIA V, RAIOLA A, CARPUTO D, FILIPPONE E, BARONE A, RIGANO M M. A basic Helix-Loop-Helix (SIARANCIO), identified from a *Solanum pennellii* introgression line, affects carotenoid accumulation in tomato fruits. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3699.
- [41] WANG C C, SULLI M, FU D Q. The role of phytochromes in regulating biosynthesis of sterol glycoalkaloid in eggplant leaves. *PLoS ONE*, 2017, 12(12): e0189481.
- [42] WANG C C, FU D Q. Virus-induced gene silencing of the eggplant chalcone synthase gene during fruit ripening modifies epidermal cells and gravitropism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(11): 2623-2629.
- [43] FU X, SHI Z H, JIANG Y, JIANG L L, QI M F, XU T, LI T L. A family of auxin conjugate hydrolases from *Solanum lycopersicum* and analysis of their roles in flower pedicel abscission. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 233.
- [44] CHANDAN R K, SINGH A K, PATEL S, SWAIN D M, TUUEJA N, JHA G. Silencing of tomato *CTR1* provides enhanced tolerance against tomato leaf curl virus infection. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(3): e1565595.
- [45] ZHANG H J, YAN M J, DENG R, SONG F M, JIANG M. The Silencing of *DEK* reduced disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato *DC3000* based on virus-induced gene silencing analysis in tomato. *Gene*, 2020, 727: 144245.
- [46] QIU Z K, YAN S H, XIA B, JIANG J, YU B W, LEI J J, CHEN C M, CHEN L, YANG Y, WANG YQ, TIAN S B, CAO B H. The eggplant transcription factor *MYB44* enhances resistance to bacterial wilt by activating the expression of spermidine synthase. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(19): 5343-5354.
- [47] ALI N, ANSAR H, MUHAMMAD A, MUHAMMAD I K, MUHAMMAD F A, MADIHA Z, KHALID A K, HAMED A G, HE S L. A novel MYB transcription factor *CaPHL8* provide clues about evolution of pepper immunity against soil borne pathogen. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137(12): 103758.
- [48] WANG G P, KONG J, CUI D D, ZHAO H B, NIU Y, XU M Y, JIANG G F, ZHAO Y H, WANG W Y. Resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato depends on the methionine cycle and the γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *The Plant Journal*, 2019, 97(6): 1032-1047.
- [49] ZHANG Y, XU K D, PEI D L, YU D S, ZHANG J, LI X L, CHEN G, YANG H, ZHOU W J, LI C W. *ShORR-1*, a novel tomato gene, confers enhanced host resistance to *Oidium neolycopersici*. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10(7): 1400.
- [50] CHENG Y, AHAMMED G J, YAO Z P, YE Q J, RUAN M Y, WANG R Q, LI Z M, ZHOU G Z, WAN H J. Comparative genomic analysis reveals extensive genetic variations of WRKYs in solanaceae and functional variations of *CaWRKYs* in pepper. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 492.
- [51] COX D E, DYER S, WEIR R, CHESETO X, STURROCK M, COYNE D, TORTO B, MAULE A G, DALZELL J J. ABC transporter genes *ABC-C6* and *ABC-G33* alter plant-microbe-parasite interactions in the rhizosphere. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 19899.
- [52] ZHOU X H, LIU J, BAO S Y, YANG Y, ZHUANG Y. Molecular cloning and characterization of a wild eggplant *Solanum aculeatissimum* NBS-LRR gene, involved in plant resistance to meloidogyne incognita. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 583.
- [53] LIN J H, DANG F F, CHEN Y P, GUAN D Y, HE S L. *CaWRKY27* negatively regulates salt and osmotic stress responses in pepper. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 145(12): 43-51.
- [54] LIU T, DU Q J, LI S Z, YANG J Y, LI X J, XU J J, CHEN P X, LI J M, HU X H. *GSTU43* gene involved in ALA-regulated redox homeostasis, to maintain coordinated chlorophyll synthesis of tomato at low temperature. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 323.
- [55] LIM J S, LIM C W, LEE S C. Functional analysis of pepper F-box protein *CaDIF1* and its interacting partner *CaDIS1*: Modulation of ABA signaling and drought stress response. *Frontiers in Plant Science*,

- 2019, 10: 1365.
- [56] CHEN X H, DUAN X F, WANG S, WU W Y, ZHANG X C. Virus-induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of *MYB80* gene involved in *Solanum lycopersicum* cold tolerance. *Protoplasma*, 2019, 256(2): 409-418.
- [57] 朱梦卓, 赵俊杰. 基于 SCIE 收录论文的中日基因编辑技术领域国际合作比较. *中华医学图书情报杂志*, 2019, 28(3): 32-41.
- ZHU M Z, ZHAO J J. Comparison of SCIE-covered international cooperation papers on gene editing technology between people's republic of China and Japan. *Chinese Journal of Medical Library and Information Science*, 2019, 28(3):32-41. (in Chinese)
- [58] WANG H Y, YANG H, SHIVALILA C S, DAWLATY M M, CHENG A W, ZHANG F, JAENISCH R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [59] 黄少勇, 王娟, 王柏柯, 李宁, 唐亚萍, 杨生保, 杨涛, 张国儒, 帕提古丽·艾斯木托拉, 高杰, 余庆辉. CRISPR/Cas9 技术在园艺作物中的研究进展. *新疆农业科学*, 2020, 57(07): 1223-1232.
- HUANG S Y, WANG J, WANG B K, LI N, TANG Y P, YANG S B, YANG T, ZHANG G R, PATIGULI A, GAO J, YU Q H. Application progress of CRISPR/Cas9 technology in horticultural crops. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2020, 57(7): 1223-1232. (in Chinese)
- [60] 许志茹, 刘通, 崔国新, 李春雷, 马静, 李玉花. 茺菁二氢黄酮醇 4-还原酶基因的克隆与功能鉴定. *园艺学报*, 2014, 41(4): 687-700.
- XU Z R, LIU T, CUI G X, LI C L, MA J, LI Y H. Cloning and function identification of dihydroflavonol 4-reductase genes in turnip. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(4): 687-700. (in Chinese)
- [61] YIN Y L, QIN K Z, SONG X W, ZHANG Q H, ZHOU Y H, XIA X J, YU J Q. *BZR1* transcription factor regulates heat stress tolerance through FERONIA receptor-like kinases-mediated reactive oxygen species signaling in tomato. *Plant Cell Physiology*, 2018, 59(11): 2239-2254.
- [62] BU R F, WANG R H, WEI Q C, HU H Y, SUN H L, SONG P W, YU Y G, LIU Q L, ZHENG Z C, LI T, LI D X, WANG L, CHEN S J, WU L L, WU J Y, LI C W. Silencing of glycerol-3-phosphate acyltransferase 6 (*GPAT6*) gene using a newly established virus induced gene silencing (VIGS) system in cucumber alleviates autotoxicity mimicked by cinnamic acid (CA). *Plant and Soil*, 2019, 438: 329-346.
- [63] LIAO J J, WANG C H, XING Q J, LI Y P, LIU X F, QI H Y. Overexpression and vigs system for functional gene validation in oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa makino*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, 137: 275-284.
- [64] WEST N W, GOLENBERG E M. Gender-specific expression of GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE is critical for unisexual organ initiation in dioecious *Spinacia oleracea*. *The New phytologist*, 2018, 217(3): 1322-1334.
- [65] 李雅博, 李婷, 韩莹琰, 范双喜. 叶用莴苣热激蛋白基因 *LsHsp70-2711* 的克隆及高温胁迫下的功能分析. *中国农业科学*, 2017, 50(8): 1486-1494.
- LI Y B, LI P, HAN Y Y, FAN S X. Cloning and function analysis of heat-shock-protein *LsHsp70-2711* gene under high temperature stress in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(8): 1486-1494. (in Chinese)
- [66] YU J, GAO L W, LIU W S, SONG L X, XIAO D, LIU T K, HOU XILIN, ZHANG C W. Transcription coactivator ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates leafy head formation in Chinese cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 520.
- [67] LUO S, LUO T, PENG P, LI Y P, LI X G. Disturbance of chlorophyll biosynthesis at Mg branch affects the chloroplast ROS homeostasis and Ca^{2+} signaling in *Pisum sativum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 127(3): 729-737.
- [68] SONG J J, YE G L, QIAN Z, YE Q. Virus-induced plasma membrane aquaporin *PsPIP2;1* silencing inhibits plant water transport of *Pisum sativum*. *Botanical Studies*, 2016, 57(1): 15.
- [69] AKI I, KOUSUKE Y, TOMOKAZU S, YUKARI T, EMIKO S, AKIHIRO T, HAJIME Y, NORIKO Y, TSUBASA T, MASAMICHI I, HIDEKI T, NOBUYUKI Y. *Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits and legumes. *Virology*, 2009, 386(2): 407-416.
- [70] MA C F, LIU M C, LI Q F, SI J, REN X S, SONG H Y. Efficient *BoPDS* gene editing in cabbage by the CRISPR/Cas9 system. *Horticultural Plant Journal*, 2019, 5(4): 164-169.
- [71] CONSTANTIN G D, KRATH B N, MACFARLANE S A, NICOLAISEN M, JOHANSEN I E, LUND O S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant Journal*, 2004, 40(4): 622-631.
- [72] ZHANG C Q, BRADSHAW J D, WHITHAM S A, HILL J H. The Development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 52-65.
- [73] 刘天波, 蔡海林, 滕凯, 曾维爱, 毛辉, 魏润洁, 周志成, 周向平, 戴良英, 唐前君. 病毒诱导的基因沉默防控烟草马铃薯 Y 病毒病研究. *中国烟草学报*, 2020, 26(5): 82-89.
- LIU T B, CAI H L, TENG K, ZENG W A, MAO H, WEI R J, ZHOU

- Z C, ZHOU X P, DAI L Y, TANG Q J. Control of tobacco potato virus Y by virus-induced gene silencing. *Acta Tabacaria Sinica*, 2020, 26(5): 82-89. (in Chinese)
- [74] 李姣, 于宗霞, 冯宝民. 植物中病毒诱导基因沉默技术的研究与应用进展. *分子植物育种*, 2019, 17(5): 1537-1542.
- LI J, YU Z X, FENG B M. Advances in research and application of virus induced gene silencing in plants. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(5): 1537-1542. (in Chinese)
- [75] NEENA M, ELIZABETH A W, KARL E R, PENG L, RITESH G J, CHRISTELLE T A, STEPHEN J F, BERNARD J C, LU G Q, XU Z P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 2017, 3(2): 16207.
- [76] JAMES A B, THIERRY B, WILLIAM C, GREGORY R H, PASCALE F, OLIVER, SCOTT J, GEERT P, TICHAFI M, MICHAEL P, TY V, JAMES R. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [77] 王栋, 陈源泉, 李道亮, 朱万斌, 谭伟明, 杜太生, 田见晖, 康绍忠. 农业领域若干颠覆性技术初探. *中国工程科学*, 2018, 20(6): 57-63.
- WANG D, CHEN Y Q, LI D L, ZHU W B, TAN W M, DU T S, TIAN J H, KANG S Z. Foresight of disruptive technologies in agricultural engineering. *Engineering Science*, 2018, 20(6): 57-63. (in Chinese)
- [78] ZHU K Y, PALLI S R. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 2020, 65(1): 293-311.
- [79] 张守路, 饶力群, 汪启明. 基于 RNAi 的转基因作物研发进展. *现代农业科技*, 2018(21): 3-4, 6.
- ZHANG S L, RAO L Q, WANG Q M. Advances in research and development of genetically modified crops based on RNAi. *XianDai NongYe KeJi*, 2018(21): 3-4, 6. (in Chinese)
- [80] DONOHUE P D, BARRANGOU R, MAY A P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(2): 134-146.
- [81] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols*, 2014, 9(7): 1549-1562.
- [82] 周洋丽, 侯朔, 郑正权, 高燕会, 童再康. 基于 VIGS 基因沉默体系的锦葵 *LsMYBs* 基因功能研究. *农业生物技术学报*, 2020, 28(6): 974-983.
- ZHOU Y L, HOU S, ZHENG Z Q, GAO Y H, TONG Z K. Study on *LsMYBs* gene function in *Lycoris sprengeri* based on VIGS gene silencing system. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(6): 974-983. (in Chinese)
- [83] CAI Q, QIAO L L, WANG M, HE B Y, LIN F M, PALMQUIST J, HUANG H D, JIN H L. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-1129.

(责任编辑 赵伶俐)