

VIGS载体在蔬菜作物中的应用研究进展

季娜娜, 闵德栋, 邵淑君, 李富军, 张新华*

山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博255049

摘要: 病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是一种RNA介导的植物抗病毒机制, 近年来在蔬菜作物基因功能的研究中, VIGS作为一种快速、高效、高通量的反向遗传学新技术发挥了重要作用。由于VIGS技术需要借助病毒载体来实现, 所以选择适宜的病毒载体是在性状各异的蔬菜中成功构建VIGS体系的关键。本文介绍了在蔬菜作物中应用的VIGS载体及其在基因功能研究中的应用实例, 并分析了病毒载体在诱导蔬菜作物基因沉默时存在的一些问题及解决方法。

关键词: VIGS; 病毒载体; 蔬菜; 研究进展

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是植物体内普遍存在一种抵御外源核酸入侵的防御反应机制, 属于转录后基因沉默的现象(张新华和李富军2012)。目前, VIGS已发展成为一种通过重组病毒来沉默植物内源基因的反向遗传学新技术, 即利用携带目的基因片段的重组病毒载体侵染植株, 随着病毒的复制和转录而特异性地诱导序列同源基因mRNA降解或被甲基化等修饰, 使植物内源基因的表达受到抑制, 引起植物表型或生理指标的变化, 进而阐明目的基因的功能。因VIGS技术具有不需要进行遗传转化、研究周期短、成本低及高通量等优势, 已成为功能基因组学研究领域中最具吸引力的技术之一(Fu等2006)。

VIGS技术由于需要借助病毒载体来实现, 所以, 目前VIGS技术的应用研究主要围绕病毒载体的开发或改造和植物基因功能的研究而展开。目前常用的VIGS病毒载体主要包括DNA病毒载体、RNA病毒载体和卫星病毒载体3大类(张新华和李富军2012)。在蔬菜作物中, VIGS目前采用的病毒载体多为RNA病毒载体。与其他科属的蔬菜作物相比, 茄科蔬菜作物有相对较多的病毒载体已被证明可以有效诱导基因沉默, 如烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、番茄曲叶(*Tomato leaf curl virus*, ToLCV)及黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)、马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)以及苹果潜隐球形病毒(*Apple latent spherical virus*, ALSV)等为基础进行改造而获得的VIGS载体。

除此之外, 随着VIGS技术的不断发展, 在许多其他科属的蔬菜作物上也已成功构建了VIGS体

系, 为蔬菜作物新基因的寻找及基因功能的研究开辟了一条快捷高效的途径。本文就VIGS病毒载体在蔬菜作物中的应用研究进展及存在的问题进行了综述和分析。

1 烟草脆裂病毒VIGS载体在蔬菜作物上的应用

TRV是一种土壤传播病毒, 属于RNA病毒属, 该病毒的基因组中含有2条RNA链: RNA1和RNA2。RNA1能编码RNA聚合酶基因、运动蛋白以及富含半胱氨酸的蛋白质; RNA2能编码衣壳蛋白以及克隆目标基因的酶切位点, RNA1和RNA2两条链构成二元载体, 因此, TRV介导的基因沉默需要RNA1和RNA2的同时作用(Ratcliff等2001; Senthil-Kumar和Mysore 2014)。

TRV病毒寄主范围广泛, 可以感染多种草本植物和作物, 改造后的病毒可以促进病毒序列的插入以及后续的侵染, 并且可以直接以宿主植物生长点的RNA为目标, 具有沉默效率高、持续时间长、引起的病毒症状轻等优点, 是目前VIGS技术中应用最为广泛的病毒载体(Kumar等2012; Zhou等2012)。

1.1 茄科蔬菜中TRV载体的应用

1.1.1 番茄

TRV载体介导的VIGS在番茄中已被广泛的应用, 目前在番茄植株及果实中利用TRV均已成功构建了VIGS体系。而且, 随着TRV载体各种改良形式的开发, 以及接种方式的多样化(农杆菌注射、农杆菌渗透、农杆菌灌根等), 使TRV介导的VIGS在番茄中的应用更加灵活高效。例如, 梅眉等

收稿 2016-04-05 修定 2016-05-16

资助 国家自然科学基金(31201432)。

* 通讯作者(E-mail: zxh@sdut.edu.cn)。

(2013)克隆了南方根结线虫的ATP合成酶g亚基(ATP synthase g subunit)基因*Asg*, 并利用VIGS技术将其导入番茄植株, 使该基因沉默, 研究了*Asg*基因与根结线虫病害的关系。结果发现, *Asg*基因沉默对根结线虫病害有很好的防控作用, *Asg*基因可能参与了根结线虫的致病性。乙烯、水杨酸等信号分子在调节植物抵抗各种逆境胁迫的过程中均发挥了重要作用(孙军利等2014; 王娟和黄荣峰2015)。Chen等(2009)利用TRV介导的VIGS技术沉默了番茄体内乙烯、水杨酸以及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导途径中的多个基因, 进一步揭示了与乙烯、水杨酸以及MAPK相关的防御信号途径参与了番茄抵抗细菌性枯萎病的过程, 共同构成了番茄抵抗细菌性枯萎病的多层防御体系。另外, Senthil- Kumar和Mysore (2011)指出TRV介导的VIGS在番茄中也可诱导可遗传的转录后水平的基因沉默。

1.1.2 辣椒

目前研究表明, 一些基因已经成功在辣椒中通过VIGS技术被沉默, 所应用的载体主要是TRV。如Chung等(2004)利用TRV介导的VIGS技术, 在辣椒中沉默了核酮糖二磷酸羧化酶小亚基(ribulose biphosphate carboxylase small subunit, *rbcS*)和八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, *PDS*)的基因, 2周之后辣椒植株出现了明显的浅黄色和光漂白现象。经Northern blot分析发现*rbcS*和*PDS*基因的表达水平明显降低。这是第一次在辣椒中成功运用了VIGS技术, 这为辣椒基因功能的研究提供了有力的工具。马宁等(2014)也以辣椒恢复系*I21C*为材料, 成功构建了控制花器官发育的B基因*PAP3*和*PDS*基因的重组载体TRV-*PAP3*和TRV-*PDS*, 为辣椒花器官发育过程中*PAP3*基因功能的研究提供了实验材料。

呈现紫色的观赏性辣椒经济价值较高, 其紫色的呈现是由于花青素的积累造成的(王华等2015)。Zhang等(2015)以TRV介导的VIGS技术沉默了辣椒的MYB转录因子的基因, 研究了MYB对花青素合成的调控。结果发现参与花青素生物合成的12个结构基因中除了苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶和水稻4-香豆酸CoA连接酶外, 其他基因的表达均受到不同程度的抑制, 这表明MYB在

调节与花青素生物合成相关的基因表达中发挥着重要的作用。Arce-Rodríguez和Ochoa-Alejo (2015)为了研究酰基转移酶3 (acyltransferase3, AT3)基因在辣椒素合成中的作用, 构建了TRV-*AT3*重组载体, 沉默*AT3*基因。结果表明, 沉默植株中*AT3*基因的表达量、辣椒碱和二氢辣椒碱的含量分别降低了81.1%、89.6%和87.7%, 而且*AT3*的沉默也导致参与辣椒素生物合成相关基因的表达明显降低。

1.1.3 茄子

Liu等(2012)利用TRV病毒载体沉默了茄子的*PDS*基因, 沉默植株的叶片出现了光漂白现象。为了进一步验证在茄子中该技术的可靠性, Liu等(2012)又选择了茄子中编码镁螯合酶H亚基的基因(H subunit of magnesium protoporphyrin chelatase, *ChlH*)及其同源基因(*Su*)以及编码1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶的基因(chloroplasto alterados, *CLAI*)为报告基因, 结果发现*ChlH*和*Su*基因的沉默使茄子的叶片发黄, 而*CLAI*基因沉默后茄子植株中出现白化现象。除上述表征外, 沉默植物中上述基因的表达量也明显的下降。由此表明, TRV介导的VIGS体系可以成功地应用在茄子中, 为茄子基因功能的研究提供了一种快速、高效的方法。赵祯等(2015)也利用TRV载体沉默了编码甲硫氨酸亚砷还原酶(sequence of methionine sulfoxide reductase A, *SmMsrA*)的基因, 发现沉默植株的叶片呈花叶状, 果实变小, 表明*SmMsrA*基因参与茄子果实发育的正向调控。

1.2 十字花科蔬菜中TRV载体的应用

十字花科植物在世界范围内广泛分布, 主要集中在北温带地区, 在我国分布也极为广泛。

张怡等(2013)通过扩增棉花、大豆、拟南芥的*CLA*的基因片段, 并将其分别与改造后的TRV病毒载体构建重组载体, 通过农杆菌侵染焯菜并观察其表型变化。实验结果表明不同的*CLA*基因构建的重组载体均使得焯菜出现不同程度的白化现象, 但是由同为十字花科的拟南芥*CLA*基因构建的重组载体侵染的焯菜白化现象最为严重, 说明不同物种的同源性基因可导致基因的沉默, 但是沉默效果有差异; 而焯菜的*CLA*基因与拟南芥、棉花和大豆的同源性分别为95%、77%和78%, 说明同源性在77%以上即可引起沉默, 且同源性越高, 沉

默效果越好,这与先前Holzberg等(2002)研究结果所说的同源性在85%以上即可引起沉默相比,又为VIGS同源片段的扩增提供了新的理论依据。

TRV载体在油菜中也成功建立了VIGS沉默体系。如王文静等(2015)利用TRV载体,构建了茉莉素受体复合蛋白(coronatine insensitive 1)基因*COII*的重组载体TRV-*COII*,通过农杆菌侵染的方法,使得该基因沉默。结果表明,*COII*沉默的植株结实能力显著降低,其角果在授粉20 d以后的长度只达到对照油菜角果授粉5 d后的长度,角果中无正常种子,而且植株蚜虫的数量显著增多,所以,*COII*基因的沉默可能会导致油菜不育性状的发生,并降低植株对蚜虫的抗性。

1.3 藜科蔬菜中TRV载体的应用

甜菜属于藜科植物,2013年甜菜全基因组的测序已完成,这对于甜菜育种、基因功能鉴定等研究具有里程碑意义,但甜菜获得稳定的遗传转化体较为困难,所以,建立针对于甜菜的VIGS体系对于鉴定大量的基因序列信息具有重要的意义。龚攀等(2015)利用TRV病毒载体在农杆菌的介导下侵染甜菜幼苗叶片,发现叶片出现了卷曲和局部颗粒状突起,表现出侵染症状,随后课题组利用TRV与番茄的*PDS*基因构建了重组载体,在农杆菌介导下侵染甜菜植株,7周后植株叶片出现边缘泛黄并略显透明的表征,经PCR验证在被侵染的植株叶片中发现了目标片段,该研究结果为构建甜菜的VIGS体系奠定了基础。

2 番茄曲叶及黄化曲叶病毒VIGS载体在蔬菜作物上的应用

ToLCV与TYLVC均属于双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*),主要分布于热带和亚热带地区,可侵染番茄、烟草、南瓜、木薯、棉花等重要的经济作物(Liu等2013; Verlaan等2013)。这两种病毒的基因组均为单链环状的DNA-A,包含6个开放阅读框(open read frame, ORF):其中AV1和AV2位于病毒链上,编码衣壳蛋白;其他ORF位于互补链上,编码复制相关蛋白(AC1)、转录激活蛋白(AC2)、复制增强子蛋白(AC3)和症状决定因子(AC4)(Yadav等2015; Bar-Ziv等2015; van Wezel等2002; Vu等2013)。

目前ToLCV介导的VIGS体系仅在番茄中构

建成功。Pandey等(2009)分别以番茄中增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的基因与ToLCV构建重组载体ToLCV-*PCNA*和ToLCV-*GFP*,并以农杆菌渗透的方法侵染番茄,结果ToLCV-*GFP*处理过的植株在渗透后6 d叶片有荧光物质生成;ToLCV-*PCNA*侵染过的植株出现了生长显著矮化的表征,而且*PCNA*的转录水平明显下降,而空载体处理过的植株并未出现明显的表型改变。

由TYLVC构建的VIGS体系在白菜基因功能的研究中已有成功的应用。在研究白菜的细胞质不育中发现一种bHLHs (basic helix-loop-helix proteins)转录因子*BcbHLHpol*,可能在调控花粉的发育中起作用,但其机制尚不明确。Liu等(2014)构建了TYLVC-*bHLHpol*重组载体,并侵染不结球白菜,结果发现受侵染植株有雄性不育和植株矮小甚至花粉的败育的表征出现,这表明*BcbHLHpol*在花粉发育中发挥着正向调控的作用。进一步的研究表明*BcbHLHpol*可被低温诱导,推测该基因在减数分裂中起着重要的作用。

3 苹果潜隐球形病毒VIGS载体在蔬菜作物上的应用

ALSV属于樱桃锉叶病毒属(*Cheravirus*)(Le Gall等2007),最早是在苹果树中发现的。该病毒有2条单链RNA(RNA1和RNA2),以及3种衣壳蛋白。其中, RNA1长度为6 813 bp,有一个单独的ORF,编码1个含有蛋白酶辅助因子、NTP结合解旋酶、半胱氨酸蛋白酶以及RNA聚合酶的复合体; RNA2的长度为3 385 bp,也有1个编码多肽的ORF,包括1个N端的移动蛋白以及C端的3个衣壳蛋白(Li等2000)。

ALSV可以侵染苹果、梨等蔷薇科植物(Chantreau等2015),拟南芥、番茄等(Igarashi等2009)茄科植物,以及葫芦科和豆科植物(Nakatsuka等2015),并且不会引起严重的病毒侵染症状。但是,ALSV病毒基因组的表达模式影响其在VIGS技术中的应用。因为,ALSV病毒的RNA翻译时先合成1个分子质量很大的前体蛋白,再由专一的蛋白酶加工裂解,才能成为成熟的蛋白质,这就要求目标基因序列必须与ALSV的克隆位点相连接,所以ALSV很难像其他载体一样高通量的表达植物基因组(Nakatsuka等2015);而且ALSV属于木质部难养菌,因此只能感染植株的韧皮部,这也限制了该载体

的应用范围(Chantreau等2015)。目前在葫芦科、豆科等蔬菜作物上已经成功构建了以ALSV为载体的VIGS体系。

3.1 葫芦科蔬菜中ALSV载体的应用

ALSV可以侵染大多数的葫芦科植株。Igarashi等(2009)利用黄瓜叶片中的*PDS*和*Su*基因分别与ALSV病毒构建了ALSV-*PDS*和ALSV-*Su*重组载体,并利用农杆菌转化法接种黄瓜、香瓜、西葫芦、西瓜、葫芦和丝瓜的子叶,发现侵染ALSV-*PDS*重组载体的植株都出现了与敲除*PDS*基因一样的光漂白现象,而且用ALSV-*Su*处理的植株也均出现了因*Su*沉默而导致的叶片发黄的表征。但是用相同方法处理南瓜子叶,未出现明显的沉默表型。

3.2 豆科及其他蔬菜作物ALSV载体的应用

豆科植物中也已成功构建了以ALSV为载体的VIGS体系, Igarashi等(2009)从大豆植物中提取*PDS*基因与ALSV构建重组载体后分别侵染大豆、豌豆、菜豆和豇豆植株的第1片叶子,发现受侵染植株的第3片叶子开始出现白色斑点的沉默表型,随后的第4和第5片叶子也延续了光漂白的表征,这种沉默现象持续了约1个月的时间,但豇豆植株叶片被重组载体侵染之后,出现了叶片发黄的表征,这与*PDS*基因沉默会导致叶片出现光漂白的现象不符,需要进一步的探究。

除了豆科作物外, Igarashi等(2009)还分别在番茄、拟南芥与瓜类等蔬菜和其他植物中进行了VIGS实验,如用ALSV-*PDS*侵染过的拟南芥植株在接种后8~14 d内都出现了光漂白现象,并且漂白现象持续了2个月之久;半定量PCR结果表明,沉默叶片中的*PDS*基因表达量明显降低。

4 马铃薯X病毒

PVX是自然界中广泛存在的一种RNA病毒,其宿主范围广泛,可以侵染以茄科植物为主的16个科的植物。该病毒基因组含有5个ORF: ORF1编码病毒的RNA聚合酶; ORF2~ORF4三个基因相互重叠,称为三基因区段,参与编码移动蛋白; ORF5参与编码衣壳蛋白(曲静等2003)。

Faivre-Rampant等(2009)报道,基于PVX病毒的VIGS载体可有效地诱导二倍体与四倍体马铃薯的叶片与块茎中*PDS*基因的沉默,而且PVX介导的*PDS*基因沉默在体外四倍体马铃薯的组培苗中可

以持续多个周期。张晓萝和赵君(2013)也利用PVX病毒与*PDS*基因构建的重组载体,研究了不同的侵染方式对多个马铃薯品种VIGS效果的影响。结果发现,不同品种的马铃薯*PDS*基因沉默差异较大,而不同的侵染方式对VIGS介导的*PDS*沉默效果无明显影响。基于PVX病毒的VIGS技术不但有助于马铃薯表达序列标签的大规模功能分析,并为马铃薯块茎及试管薯发育机制的研究提供了一种非侵入性的反向遗传学方法。

5 VIGS载体应用中的问题及应用展望

尽管目前已成功构建了多个可以在蔬菜作物中应用VIGS技术的病毒载体,但是在蔬菜中实施该技术时还存在以下几个问题。

5.1 环境影响

环境对于病毒在宿主植物中的扩散能力有很大的影响,而温度是病毒粒子扩散的最主要的影响因子。根据植物种类的不同,引起最高沉默效率的温度也不一样。实验证明番茄出现较好的沉默表型是在21°C甚至更低的温度(Fu等2006);而茄子在20~25°C均可出现有效的沉默效果(赵祯等2015)。因此,即使同一种病毒载体,针对不同的蔬菜作物仍需摸索引起有效沉默效果的适宜温度。

5.2 载体对宿主的选择性

现阶段尽管已经有多种病毒载体被成功的应用到VIGS体系中来,但是还有很多蔬菜作物仍然没有合适的病毒载体。另外,有的虽然已构建了VIGS体系,但是其沉默效果并不可观,比如TRV载体虽然可以侵染多种蔬菜作物,但是在不同的植物中,病毒的扩散和繁殖能力有很大差距。一般来说,TRV载体在茄科植物中的扩散和增殖能力较强(赵祯等2015)。

5.3 载体的致病性

病毒是蔬菜作物的重要病原物,且大多数植物病毒都可以昆虫为介体进行传播。所以,虽然植物病毒种类繁多,但并不是所有的病毒都适用于VIGS体系的建立。为避免因使用病毒载体而引起的蔬菜病毒病危害和流行,在构建VIGS病毒载体时就需要选用当地已经存在的、无虫传能力的弱毒株,这样也有利于基因沉默表型的观测。对于致病性强的病毒,可通过敲除或突变与致病相关的基因后再应用于VIGS体系中。

5.4 侵染方式的影响

由于不同植株对病毒载体的敏感程度不同, 因此在进行侵染时, 侵染方式也对VIGS沉默效率有一定的影响。目前应用较为广泛的侵染方法主要有以下几种: 叶背注射渗透法、根吸收法、机械伤口侵染法、微粒轰击法(Ruiz等1998)以及真空渗透法(Yan等2012)等。一般来说TRV载体用不同的侵染方法都可以达到较为理想的沉默效果, 但是对于机械伤口侵染法来说TRV介导的VIGS技术效果不佳(Zhang等2010)。

综上所述, 虽然VIGS技术在蔬菜中的实施还存在很多的问题, 但是因为利用病毒载体可以同时沉默多个基因, 且各个基因之间无影响, 从而使得该技术可以快速、高效、高通量的沉默目的基因, 有着其他基因功能研究技术所不能比拟的优点, 还是植物基因组功能研究的主要方法之一, 并在以后蔬菜品种的改良以及防止病虫害等方面的研究中发挥更大的作用。

参考文献

- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N (2015). Silencing *AT3* gene reduces the expression of *pAmt*, *BCAT*, *Kas*, and *Acl* genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biol Plant*, 59 (3): 477–484
- Bar-Ziv A, Levy Y, Citovsky V, Gafni Y (2015). The *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) V2 protein inhibits enzymatic activity of the host papain-like cysteine protease CYP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 460 (3): 525–529
- Chantreau M, Chabbert B, Billiard S, Hawkins S, Neutelings G (2015). Functional analyses of cellulose synthase genes in flax (*Linum usitatissimum*) by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol J*, 13 (9): 1312–1324
- Chen YY, Lin YM, Chao TC, Wang JF, Liu AC, Ho FI, Cheng CP (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant*, 136 (3): 324–335
- Chung E, Seong E, Kim YC, Chung EJ, Oh SK, Lee S, Park JM, Joung YH, Choi D (2004). A method of high frequency virus-induced silencing in chili pepper (*Capsicum annuum*. L. cv. Bukang). *Mol Cell*, 17 (2): 377–380
- Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiol*, 134 (4): 1308–1316
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Zhang HX, Xie YH, Jiang WB (2006). Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Mol Cell*, 21 (1): 153–160
- Gong P, Cui J, Li JL, Luo CF, Yang HC (2015). Application of virus-induced gene silencing in *Beta vulgaris*. *Chin J Bioinform*, 13 (1): 18–22 (in Chinese with English abstract) [龚攀, 崔杰, 李俊良, 罗成飞, 杨虎臣(2015). VIGS在甜菜上的应用. *生物信息学*, 13 (1): 18–22]
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP (2002). *Barley stripe mosaic virus* - induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J*, 30 (3): 315–327
- Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, Takahashi Y, Sugawara E, Tamura A, Yaegashi H, Yamagishi N, Takahashi T, Isogai M, et al (2009). *Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a board range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology*, 386: 407–416
- Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT (2012). *Tobacco rattle virus* vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. *PLoS One*, 7 (2): e31347–e31356
- Le Gall O, Sanfacon H, Ikegami M, Iwanami T, Jones T, Karasev A, Lehto K, Wellink J, Wetzell T, Yoshikawa N (2007). *Cheravirus* and *Sadwavirus*: two unassigned genera of plant positive-sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus *Nepovirus* (family *Comoviridae*). *Arch Virol*, 152 (9): 1767–1774
- Li C, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Yoshida K, Koganezawa H (2000). Nucleotide sequence and genome organization of *Apple latent spherical virus*: a new virus classified into the family *Comoviridae*. *J Gen Virol*, 81 (2): 541–547
- Liu BM, Preisser EL, Chu D, Pan HP, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Zhou XG, Zhang YJ (2013). Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. *J Virol*, 87 (9): 4929–4937
- Liu HP, Fu DQ, Zhu BZ, Yan HX, Shen XY, Zuo JH, Zhu Y, Luo YB (2012). Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). *J Integr Plant Biol*, 54 (6): 422–429
- Liu TK, Li Y, Zhang CW, Duan WK, Huang FY, Hou XL (2014). Basic helix-loop-helix transcription factor *BcbHLHpol* functions as a positive regulator of pollen development in non-heading Chinese cabbage. *Funct Integr Genomics*, 14 (4): 731–739
- Ma N, Liu C, Wang RF, Shen HL (2014). Construction and identification of flowering-related *PAP3* gene and *PDS* gene VIGS vector in pepper. *Chin Cucurbits Veget*, 27 (1): 10–12 (in Chinese with English abstract) [马宁, 刘辰, 王茹芳, 沈火林(2014). 辣椒花器官发育 *PAP3* 基因和 *PDS* 基因 VIGS 载体的构建及鉴定. *中国瓜菜*, 27 (1): 10–12]
- Mei M, Huang YH, Mao ZC, Liu ZM, Xie BY (2013). Molecular clone of *MiAsg* gene and the its relationship with disease caused *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Breeding*, 11 (5): 589–591 (in Chinese with English abstract) [梅眉, 黄永红, 茆振川, 刘志敏, 谢丙炎(2013). *MiAsg* 分子克隆及与南方根结线虫病害的关系. *分子植物育种*, 11 (5): 589–591]
- Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, Fujita K, Yamagishi N, Yoshikawa N, Nishihara M (2015). Isolation and characterization of the C-class *MADS-box* gene involved in the formation of double

- flowers in Japanese gentian. *BMC Plant Biol*, 15 (1): 182–195
- Pandey P, Choudhury N, Mukherjee SK (2009). 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. *J Virol*, 6: 152–164
- Qu J, Zhu CX, Wen FJ, Guo XQ, Song YZ (2003). Coat protein gene analysis and identification of an isolate of *Potato virus X*. *Acta Phytophylacica Sin*, 30 (4): 358–364 (in Chinese with English abstract) [曲静, 朱常香, 温孚江, 郭兴启, 宋云枝(2003). 一个马铃薯 X 病毒分离物的外壳蛋白基因序列分析与株系鉴定. *植物保护学报*, 30 (4): 358–364]
- Ratcliff F, Martin-hernandez M, Baulcombe DC (2001). *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 25 (2): 237–245
- Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10: 937–946
- Senthil-Kumar M, Mysore KS (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci*, 16 (12): 656–665
- Senthil-Kumar M, Mysore KS (2014). Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Protoc*, 9 (7): 1549–1562
- Sun JL, Zhao BL, Yu SL (2014). Effect of exogenous salicylic acid on antioxidant enzymes activities and antioxidants contents in grape seedlings under high temperature stress. *Plant Physiol J*, 51 (7): 1014–1018 (in Chinese with English abstract) [孙军利, 赵宝龙, 郁松林(2014). 外源水杨酸对高温胁迫下葡萄几种抗氧化酶活性和抗氧化物含量的影响. *植物生理学报*, 51 (7): 1014–1018]
- van Wezel R, Dong X, Liu H, Tien P, Stanley J, Hong Y (2002). Mutation of three cysteine residues in *Tomato yellow leaf curl virus-China* C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol Plant Microbe In*, 15 (3): 203–208
- Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RG, Scott JW, Edwards JD, Bai Y (2013). The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DF-DGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet*, 9 (3): e1003399
- Vu TV, Choudhury NR, Mukherjee SK (2013). Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the precoat and coat proteins of a begomovirus, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, show tolerance to virus infection. *Virus Res*, 172 (1): 35–45
- Wang H, Li MF, Yang Y, Jin WM (2015). Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits. *Plant Physiol J*, 51 (1): 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 杨媛, 金万梅(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. *植物生理学报*, 51 (1): 29–43]
- Wang J, Huang RF (2015). Regulation of ethylene in plant salt tolerance. *Plant Physiol J*, 51 (10): 1567–1572 (in Chinese with English abstract) [王娟, 黄荣峰(2015). 乙烯调控植物耐盐性的研究进展. *植物生理学报*, 51 (10): 1567–1572]
- Wang WJ, Yang XC, Ding YQ, Yin GY, Ma HR, Zhang J, Shi XY, Zhang DY, Li JN, Zhang HB (2015). Functional analysis of COI1 genes in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Sci Agr Sin*, 48 (10): 1882–1891 (in Chinese with English abstract) [王文静, 杨小川, 丁永强, 尹国英, 马浩然, 张洁, 石小于, 张鼎宇, 李加纳, 张洪博(2015). 甘蓝型油菜COI1的调控功能分析. *中国农业科学*, 48 (10): 1882–1891]
- Yadav K, Kumar PS, Nirmaladevi S, Mathew SK, George TE, Krishnan S (2015). Genetics of resistance to ToLCV in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J Trop Agr*, 53 (1): 63–65
- Yan HX, Fu DQ, Zhu BZ, Liu HP, Shen XY, Luo YB (2012). Sprout vacuum-infiltration: a simple and efficient agroinoculation method for virus-induced gene silencing in diverse solanaceous species. *Plant Cell Rep*, 31 (9): 1713–1722
- Zhang C, Bradshaw JD, Whitham SA, Hill JH (2010). The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiol*, 153 (1): 52–65
- Zhang XH, Li FJ (2012). Research advances of virus-induced gene silencing technology in plant. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 32 (2): 419–424 (in Chinese with English abstract) [张新华, 李富军(2012). 病毒诱导的基因沉默技术及其在植物中的研究进展. *西北植物学报*, 32 (2): 419–424]
- Zhang XL, Zhao J (2013). Progress in study of plant resistance gene function using virus induced gene silencing system. *Chin Potato J*, 27 (3): 181–186 (in Chinese with English abstract) [张晓萝, 赵君(2013). 病毒诱导的基因沉默在植物抗病基因功能研究中的应用. *中国马铃薯*, 27 (3): 181–186]
- Zhang Y, Xu KD, Yang S, Li H, Cao P, Wei S, Wei DD, Li CW (2013). Virus-induced gene silencing in *Rorippa indica* Hiern. *Acta Agric Boreali Sin*, 28 (6): 65–70 (in Chinese with English abstract) [张怡, 徐克东, 杨松, 李豪, 曹鹏, 魏森, 韦丹丹, 李成伟(2013). 蔊菜病毒诱导基因沉默体系构建. *华北农学报*, 28 (6): 65–70]
- Zhang Z, Li DW, Jin JH, Yin YX, Zhang HX, Chai WG, Gong ZH (2015). VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by *CaMYB* in chili pepper leaves. *Front Plant Sci*, 6: 1–10
- Zhao Z, Liu FZ, Zhang Y, Qi DX, Chen YH, Lian Y (2015). VIGS expression vector construction and expression analyses of *SmMsrA* gene in eggplant. *Acta Horti Sin*, 42 (8): 1495–1504 (in Chinese with English abstract) [赵祯, 刘富中, 张映, 齐东霞, 陈钰辉, 连勇(2015). 茄子*SmMsrA*基因VIGS表达载体的构建及表达分析. *园艺学报*, 42 (8): 1495–1504]
- Zhou XF, Zhao Z, Lv J, Wei XW, Cai R (2012). The feasibility analysis of PVX and TRV vectors as the VIGS tool for studying the gene function. *Physics Procedia*, 33: 46–54

Progress of research on application of VIGS vectors in vegetables

JI Na-Na, MIN De-Dong, SHAO Shu-Jun, LI Fu-Jun, ZHANG Xin-Hua*

School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) is an RNA-mediated antiviral defense mechanism of plant. In recent years, VIGS technology as a fast, effective, high-throughout reverse genetics technology has played an important role in the function study of vegetable gene. VIGS technology is based on the virus vector, so it is the key to selecting a suitable vector for successful implementation of VIGS in a variety of vegetable crops. This paper reviewed the VIGS vectors and its application examples in the gene function research in vegetable. Meanwhile, the problems and its solutions of the application of VIGS in vegetable were analyzed.

Key words: virus-induced gene silencing; virus vectors; vegetable; research progress

Received 2016-04-05 Accepted 2016-05-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31201432).

*Corresponding author (E-mail: zxh@sdut.edu.cn).