

TRV介导的VIGS技术在果蔬基因功能研究中的应用

闵德栋, 张新华*, 季娜娜, 李富军, 邵淑君

山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博255000

摘要: 病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是近年来开发的一种快速鉴定植物基因功能的反向遗传学技术。因该技术需要借助病毒载体来实现, 所以病毒载体的开发一直备受关注。在已开发的病毒载体中, 烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)具有寄主范围广、沉默效率高、可在多个组织产生沉默, 并且病毒诱导的症状轻微等独特的优势。因此, TRV-VIGS技术已成功用于多种果蔬作物基因功能的研究。本文就TRV载体的结构特点、作用机制、在果蔬基因功能研究中的应用及存在的问题等进行了分析和总结。

关键词: 病毒诱导的基因沉默; 烟草脆裂病毒; 果蔬; 基因功能

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)属于转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS), 是植物体内存在的一种防御病毒入侵的自然机制(Lu等2003)。近年来随着分子生物学技术的发展, 许多果蔬作物的全基因组测序工作正陆续完成, 但是由于基因的种类复杂多样, 需要进一步的鉴定其具体功能。传统的基因功能鉴定方法有反义转基因技术和基因敲除技术, 但是这些方法操作复杂、耗时较长, 而VIGS技术凭借快速、高效、高通量的特点成为鉴定基因功能的有力工具。

VIGS技术需要借助病毒载体来实现对内源基因的沉默, 根据已有的研究报道, 目前的病毒载体包括三大类, 分别是RNA病毒载体、DNA病毒载体和卫星病毒载体(张新华和李富军2012)。烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)最早被开发并应用于VIGS技术。Kumagai等(1995)以TMV为载体成功沉默了八氢番茄红素去饱和酶基因(*phytoene desaturase*, PDS); Ruiz等(1998)以PVX为载体实现了本氏烟(*Nicotiana benthamiana*) PDS的沉默。但是, TMV和PVX诱导的病毒症状较重且沉默表型维持时间短, 不能侵染植物的分生组织和生长点, 限制了它们的广泛应用。而烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)具有寄主范围广、沉默效率高、持续时间长、引起的病毒症状轻等优点, 在多种果蔬作物中得到了广泛的应用(Huang等2012; Zhou等2012; 季娜娜等2016)。本文就TRV载体的结构特点、作用机制及在果蔬作物基因功能研究中的应用等方面进行了综述。

1 TRV的特点及沉默载体的优化

1.1 TRV载体的特点

TRV属于RNA病毒, 病毒颗粒呈直杆状, 有2种颗粒, 长颗粒190~210 nm×25 nm, 短颗粒40~80 nm×20~25 nm (田文会和张书萍1995)。该病毒基因组中含有两条RNA链: RNA1和RNA2。RNA1能编码RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)基因、运动蛋白(movement protein, Mp)以及富含半胱氨酸的蛋白质; RNA2能编码衣壳蛋白(coat protein, Cp)以及克隆目标基因的酶切位点, 病毒颗粒极其稳定。RNA1和RNA2两条链构成双元载体, 因此TRV介导的基因沉默需要RNA1和RNA2的同时作用(Senthil-Kumar和Mysore 2014)。当采用农杆菌侵染方法时, 两个载体分别被转入到各自独立的农杆菌中, 两者混合后对植物进行共侵染。与其他病毒载体相比, TRV载体侵染方便快捷, 侵染后数天就可沉默目的基因, 与通量克隆技术结合, TRV还能实现目的基因的高通量功能分析。

1.2 TRV载体的优化

2001年, Ratciff等构建了由TRV的RNA1和RNA2 cDNA组成的双元表达载体, 两者均以CaMV-35S为启动子。在TRV RNA1上的RdRp中插入了拟南芥Col-0硝酸还原酶NIA1基因, 以利于其在大肠杆菌中稳定存在。而TRV的RNA2基因组序列只保留了5'和3'非编码序列及病毒Cp的编码基因,

收稿 2016-09-18 修定 2016-12-12
资助 国家自然科学基金(31201432和31101587)。
* 通讯作者(E-mail: zxh@sdut.edu.cn)。

切去了29.4 kDa及32.8 kDa蛋白质的编码基因, 并加入了多克隆位点(multiple cloning site, MCS), 以便目的基因的插入(图1-A)。

Liu等(2002a)为了开发TRV作为VIGS载体, 构建了含有RNA1和RNA2 cDNA克隆的T-DNA载体。RNA1和RNA2对应的cDNA分别插入CaMV35S启动子和胭脂碱合酶终止子(nopaline synthase terminator, N)之间, 并且在3'末端包含着自切割核酶(self-cleaving ribozyme, R)序列。在TRV RNA2中, 非结构基因被MCS替换(图1-B)。尽管Liu等(2002a)与Ratciff等(2001)设计的TRV载体都被称作第一代TRV VIGS载体, 但是两者在设计上和序列两方面存在差异。首先在设计方面Liu等(2002a)构建的TRV载体含有两个CaMV35S启动子, 在室温条件下大肠杆菌二元载体中的RNA1 cDNA的稳定性增强; 其次从序列方面, Liu等(2002a)的TRV载体RNA1有9个碱基(T2291C、G1266A、C3094T、A3634G、C3130T、G4123A、G4254T、G4642A和G5559A)和3个氨基酸(S355N、S697P和V78I)发生变化, RNA2有多个碱基插入(核苷酸的位置为287、380、3490、3662和3756)和变化(T338C、A339T、C340A、G342C、C343G、A344C、T654C、C3509T和A3660G)。

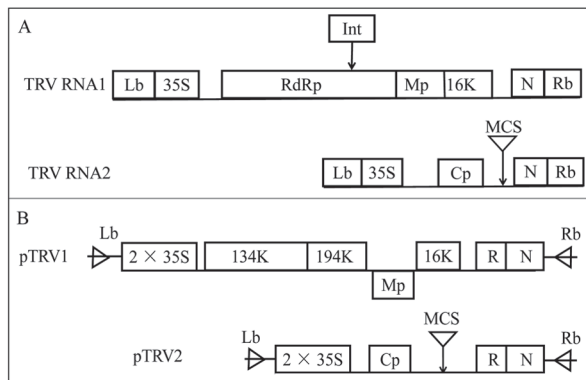


图1 基于TRV的VIGS载体

Fig.1 TRV based VIGS vectors

参考Ratciff等(2001)和Liu等(2002a)文献。A: TRV-VIGS载体; B: 改良的TRV-VIGS载体。TRV cDNA克隆位于T-DNA载体上的CaMV35S启动子(35S)及胭脂碱合成酶终止子(N)之间。Lb与Rb分别为T-DNA的左、右边界; RdRp: RNA依赖的RNA聚合酶; Mp: 运动蛋白; Cp: 衣壳蛋白; Int: 内含子; MCS: 多克隆位点; R: 自切割核酶; 16K、134K和194K分别指16、134和194 kDa蛋白的编码基因片段。

随后, Liu等(2002b)又基于Gateway重组系统构建了第2代TRV载体, 有助于促进番茄(*Solanum lycopersicum*)表达序列的大规模分析, 但是该载体构建过程耗时长, 克隆程序复杂, 花费较高。为了克服这些局限性, Dong等(2007)采用改进的不依赖连接反应克隆(ligation-independent cloning, LIC)技术构建了TRV载体, 并在番茄和本氏烟中得到验证, 表明TRV-LIC载体是一种有效的高通量VIGS载体。但是, TRV载体在非茄科作物中的侵染效率依旧比较低, Tian等(2013)构建了一个易于追踪的TRV载体, 将绿色荧光蛋白基因(*green fluorescent protein, GFP*)标记到原始TRV载体Cp基因的3'端, 改良的TRV载体在本氏烟、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和草莓(*Fragaria ananassa*)中得到验证。

2 TRV-VIGS作用机制

当植物遭受病毒侵染时, 会主动启动针对病毒基因组的抗病毒防御机制, 以抑制外源基因的表达, 维持自身基因组的稳定性。当携带植物内源基因片段的重组TRV载体侵染植物后, 会大量的复制并在RdRp作用下转录形成双链RNA (double stranded RNA, dsRNA)。dsRNA是植物内源基因沉默的关键诱导因子, 其在RNase III家族特异性核酸内切酶Dicer类似物的作用下, 被切割成21~24核苷酸的小分子干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)。siRNA在植物细胞内进一步扩增后, 以单链形式与Agronaute1 (AGO1)蛋白等结合, 形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC能够特异地引起植物细胞质中与siRNA同源序列的 mRNA降解, 从而导致目的基因发生PTGS (图2)。

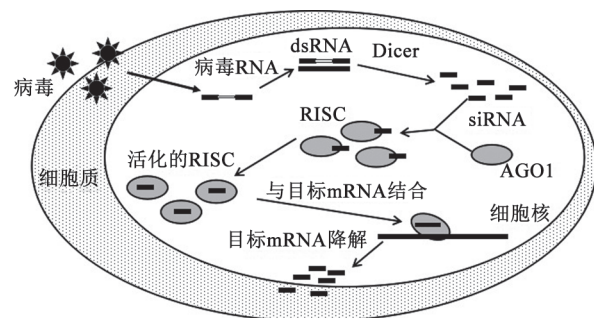


图2 VIGS原理图

Fig.2 VIGS principle

参考姚丹青等(2009)文献。

根据VIGS的作用机制,通过基因重组技术,将目的基因插入到TRV RNA2的MCS上,得到含有目的基因片段的重组病毒载体。利用获取的重组病毒载体成功侵染植物后,宿主便启动PTGS,2~3周后即可出现明显的沉默效果。

3 TRV载体在诱导果蔬作物基因沉默中的应用

3.1 TRV-VIGS在果树作物中的应用

3.1.1 TRV-VIGS在桃果实中的应用

色泽是影响桃(*Amygdalus persica*)果实外观品质的重要因素之一。研究表明,查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是花色苷合成过程中的第一个酶,对果皮色泽的形成具有重要影响。张蕾等(2015)利用TRV载体介导的VIGS技术研究了CHS沉默对桃果实花色苷代谢的影响。结果表明,抑制CHS的表达,桃果皮中花青素糖苷和槲皮素糖苷含量下降,使整个花色苷代谢途径转向绿原酸及其复合物方向。进一步证实了CHS能够控制类黄酮物质的代谢方向,是花色苷代谢途径中的重要基因。

为了研究与桃果肉性状相关基因的功能, Bai等(2015)利用TRV载体介导的VIGS技术沉默了白色果肉桃子品种的一类胡萝卜素裂解双加氧酶基因(carotenoid cleavage dioxygenase 4, CCD4),结果发现白肉桃果实中CCD4沉默部位的黄色色素及胡萝卜素含量显著增加。该结果表明, CCD4的表达是桃子果肉呈现白色的主要因素。由此可见, TRV-VIGS技术也可成功用于桃果实性状相关基因功能的研究。

3.1.2 TRV-VIGS在草莓中的应用

草莓属于蔷薇科草莓属多年生植物,在世界各地广泛种植,近几年在国内的种植范围也越来越广。草莓也是公认的蔷薇科中基因功能研究的模式植物之一。2010年草莓基因组测序的完成对草莓功能基因的研究带来巨大的促进作用。为研究VIGS技术是否可以应用于草莓中, Tian等(2015)利用TRV介导的VIGS技术,以PDS和GFP为标记基因,在草莓中构建了VIGS体系。实验结果发现,沉默植株的叶片及果实出现明显的光漂白现象,且沉默植株中PDS的表达量明显降低;利用荧光显微镜和紫外灯可以很方便的筛选GFP沉默的植株。这说明TRV介导的VIGS体系在草莓中构建成

功,为草莓基因功能的研究提供了一项简单而高效的新技术。Jia等(2011)利用TRV载体沉默了草莓中脱落酸(abscisic acid, ABA)合成关键酶9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶的基因(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED1)及ABA的受体基因CHLH/ABAR。结果发现, NCED1沉默后,草莓中的ABA含量显著降低并且果实不着色; CHLH/ABAR沉默的果实中也存在类似的现象,而且果实中的糖含量、与ABA及糖响应有关的基因表达也都显著下降。借助于VIGS技术,该研究进一步证实了ABA是促进草莓果实成熟的信号分子,而ABA可能的受体CHLH/ABAR则作为促进因子参与这一过程。

BAG (bcl-2-associated athanogene)是一类多功能蛋白家族,在哺乳动物中,对细胞凋亡以及肿瘤发生起重要的调节作用。目前, BAG家族基因在多种植物中陆续被发现。张庆雨(2014)首次从草莓中分离到BAG6的全长,并构建了TRV-BAG6重组载体,成功侵染草莓叶片。通过实时定量PCR检测发现,草莓叶片中的BAG6表达显著下降,而且草莓对胶孢炭疽菌侵染的抵抗力也下降,证明BAG6在草莓炭疽病抗性中发挥重要作用。病害是影响草莓产量的关键因素之一,利用TRV介导的VIGS技术能够高效快速的研究基因功能,并发现相关抗性基因,为提高草莓产量、防治病害提供理论基础。

3.1.3 TRV-VIGS在苹果果实中的应用

苹果(*Malus domestica*)是世界上栽培面积最广、产量最高的果树之一。随着分子生物学的发展,苹果全基因组测序已经完成,这为苹果基因功能的分析奠定了基础。目前世界上种植量最广的苹果种类为红色系苹果,该苹果色泽鲜艳诱人,类黄酮含量丰富。花青素是类黄酮的一种,在果实成熟后期逐渐形成,对果皮色泽具有重要影响。王丽辉(2014)通过VIGS技术,使花青素合成酶、查尔酮异构酶、二氢黄酮醇还原酶和苯丙氨酸解氨酶等类黄酮合成途径中的关键基因沉默,确定了调控花青素合成的关键基因,为分子育种提供理论指导。温小红等(2014)以‘澳洲青苹’果实为材料,利用VIGS技术沉默了转录因子MdHB-1的基因,分析了其对果实乙烯合成关键基因MdACO1的

表达及果实成熟相关指标的影响。结果发现, *MdHB-1*表达的抑制可使*MdACO1*的表达量下调, 明显延缓果实的成熟衰老进程。

3.1.4 TRV-VIGS在番木瓜中的应用

番木瓜(*Carica papaya*)是热带、亚热带重要水果, 具有食用、医疗、保健和工业价值。但是近年番木瓜受到病害威胁, 严重影响番木瓜产量。尽管目前与抗病有关基因功能的研究已在植物中广泛展开, 但是关于番木瓜抗病基因的研究却鲜有报道。刘国成(2010)首次以TRV为载体, 在番木瓜中应用VIGS技术鉴定抗病相关基因的功能。虽然初步构建了重组病毒载体并通过冻融法转入农杆菌GV3101中, 但是经过多次试验仍旧无法使番木瓜中的内源基因沉默并出现相应的表型变化。这可能是因为番木瓜不是TRV的寄主, 与VIGS寄主优势原则相违背, 因此不能以TRV为载体在番木瓜中构建VIGS体系(Becker和Lange 2010)。

3.1.5 TRV-VIGS在樱桃中的应用

甜樱桃(*Prunus avium*)是一种非跃变型果实, 在生长发育过程中受到ABA的调控。NCED是ABA生物合成的关键酶; 而ABA的分解代谢主要是通过8'-羟化酶催化的8'-羟基化作用, 其中小家族的P450单加氧酶CYP707A是关键酶, 在樱桃中编码该酶的cDNA有4种(*CYP707A1~4*)。Li等(2015a)以TRV为载体, 利用粒子轰击的方法沉默编码CYP707A的4个基因。结果发现, *CYP707A2*沉默促进了果实的成熟与着色, 并明显改变了ABA的响应和与成熟度相关基因的转录水平, 包括ABA合成的关键基因*NCED*、乙烯合成的相关基因*ACO1*、转录因子MYBA以及花青素合成的相关基因。*CYP707A1*沉默对果实的着色略有促进, 但明显提高了果实的抗旱能力。因此, 该研究利用VIGS技术证实了*CYP707A2*是ABA代谢的一个关键调控子, 在樱桃果实的成熟中起负调控作用; 而*CYP707A1*可以调节干旱胁迫下果实ABA的含量。

3.1.6 TRV-VIGS在荔枝中的应用

荔枝(*Litchi chinensis*)果皮红色的呈现与果皮中花青素含量密切相关, UDP-葡萄糖:类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glyco-

syltransferase, UFTG)是花青素合成的关键酶(文习成等2012; 王华等2015)。目前, 在荔枝中已确定了编码UFTG的4种基因(*LcUFTG1~4*), 发现只有*LcUFTG1*的表达与花青素的积累密切相关。为了进一步确定*LcUFTG1*的功能, Li等(2015b)利用TRV介导的VIGS技术沉默荔枝中的*LcUFTG*, 结果发现沉默组荔枝果皮出现着色延迟现象, 进一步确定了*LcUFTG1*在荔枝果皮红色形成中的重要作用。

3.2 TRV-VIGS在蔬菜作物中的应用

3.2.1 TRV-VIGS在番茄中的应用

自Liu等(2002b)利用TRV在番茄幼苗中成功建立了VIGS体系以来, TRV介导的VIGS技术在番茄植株及果实的基因功能研究中已得到了广泛应用, 尤其在抗性基因方面取得了显著进步。NBS-LRR是目前发现的最大类型的抗病基因, 这类基因编码1个核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)和1个富含亮氨酸结构域(LRR)。李楠等(2014)在番茄中克隆了1个NBS-LRR类抗病基因*CINLR*, 并利用TRV构建了重组载体pTRV2-*CINLR*, 沉默番茄植株中*CINLR*。抑制番茄体内*CINLR*的表达后, 接种番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), 结果发现, 番茄植株体内的TYLCV积累量与*CINLR*表达水平呈反比。说明*CINLR*可能为抗番茄黄化曲叶病的相关基因。梅眉等(2013)克隆了南方根结线虫的ATP合成酶g亚基基因(*ATP synthase g subunit gene*, *Asg*), 并利用VIGS技术将其导入番茄植株, 使该基因沉默。结果发现, *Asg*沉默对根结线虫病害有很好的防控作用, *Asg*可能参与了根线虫的致病性。

3.2.2 TRV-VIGS在马铃薯中的应用

马铃薯(*Solanum tuberosum*)系茄科茄属, 一年生草本植物, 其块茎是重要的粮食、蔬菜兼用作物。随着基因组学的发展, 马铃薯全基因组测序已完成, 基因功能解析成为目前的迫切任务。马铃薯中应用VIGS技术鉴定基因功能的研究已有相关报道, 如Favre-Rampent等(2004)以PVX为载体, 实现相关基因的沉默, 但是依旧存在一些问题, 如沉默效率较低且存在明显的感病症状。Brigneti等(2004)以TRV为载体沉默马铃薯植株和块茎中*PDS*。虽然TRV病毒载体侵染马铃薯植株时出现

的沉默效率比PVX的高,但是还需要实生苗且存在基因型的依赖,这使得其应用范围受到限制。

3.2.3 TRV-VIGS在辣椒中的应用

目前, VIGS技术已成功用于辣椒(*Capsicum annuum*)基因功能的鉴定,所应用的病毒载体主要是TRV。如Chung等(2004)首次利用TRV为载体,成功地沉默了辣椒中的PDS和rbcS,两周之后, PDS沉默的植株出现了明显的光漂白现象; rbcS沉默的植株出现了浅黄色,并随着时间的延长症状更加明显。VIGS体系在辣椒植株中的成功构建为辣椒基因功能的研究提供了有力的工具。2015年, Zhang等以TRV介导的VIGS技术研究了转录因子MYB对辣椒花青素合成的调控作用。结果发现,在MYB沉默的植株中,参与花青素生物合成的12个结构基因中除了肉桂酸-4-羟化酶、苯丙氨酸解氨酶和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,这表明转录因子MYB对花青素的生物合成起着重要的调控作用。为了研究酰基转移酶3基因(*acyltransferase3*, *AT3*)在辣椒素合成中的作用, Arce-Rodríguez和Ochoa-Alejo (2015)构建了TRV-*AT3*重组载体,沉默植株的*AT3*。结果发现, *AT3*的沉默使植株中辣椒碱和二氢辣椒碱的含量分别降低了89.6%和87.7%,辣椒素合成相关基因的表达也显著降低。

成熟的辣椒果实有红、黄、橙等颜色,其中以红色系最为常见,辣椒红素是辣椒果实红色的主要成分,而 β -胡萝卜素是辣椒红素的上游物质, *Lcyb*是调控 β -胡萝卜素合成的一个关键酶基因,为了探讨*Lcyb*对辣椒果实中辣椒红素含量的影响,李莉和田士林(2015)以TRV为载体,利用VIGS技术沉默了辣椒果实中*Lcyb*。结果发现, *Lcyb*沉默不仅改变了辣椒的果色, HPLC检测发现辣椒红素的含量也大幅度的降低,表明*Lcyb*与辣椒红素的合成存在着一定的调控关系。

3.2.4 TRV-VIGS在蕹菜中的应用

蕹菜(*Rorippa indica*)为十字花科草本植物,具有保健作用,同时还具有抗病、耐旱、高产量等优点。在研究蕹菜基因功能时常以1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶基因(*chloroplasto alterados*, *CLA*)作为报告基因。在植物类胡萝卜素合成的过程中,该基因与胡萝卜素的积累密切相关,当植物体内

类胡萝卜素含量下降时将出现光漂白现象。张怡等(2013)克隆了棉花(*Gossypium* spp.)、大豆(*Glycine max*)及拟南芥的*CLA*,分别与改造后的TRV病毒构建重组载体,转化农杆菌后侵染蕹菜幼苗。侵染15~20 d后,3种不同来源的*CLA*构建的重组载体均使蕹菜出现了光漂白现象,但沉默效果有差异。拟南芥的*CLA*与蕹菜的*CLA*同源性最高(95%),由其引起的沉默效果也最好,该研究为蕹菜VIGS体系的构建提供了参考。

3.2.5 TRV-VIGS在茄子中的应用

2012年, Liu等利用VIGS技术,以TRV为载体沉默了茄子(*Solanum melogena*)的PDS,沉默植株的叶片出现了光漂白现象, PDS的表达量也明显下降。由此表明, TRV介导的VIGS体系可以成功地用于茄子中。赵祯等(2015)利用该技术研究了甲硫氨酸亚砷还原酶基因(*sequence of methionine sulfoxide reductase A*, *SmMsrA*)对茄子生长发育的影响。结果表明, *SmMsrA*沉默植株的果实变小、叶片呈花叶状,推测*SmMsrA*在茄子的生长发育中起正调控作用。

3.2.6 TRV-VIGS在甜菜中的应用

甜菜(*Bete vulgaris*)是我国重要的经济作物,2013年甜菜全基因组测序已完成,这对于甜菜育种、基因功能鉴定等研究具有重要的意义。甜菜获得稳定的遗传转化体较为困难,所以在甜菜中建立VIGS体系对于鉴定大量的基因序列信息具有重要的意义(Dohm等2014)。龚攀等(2015)以番茄中的PDS和TRV载体构建重组载体,在农杆菌的介导下,侵染甜菜叶片,5周后发现甜菜叶片均出现了卷曲和局部颗粒状突起侵染症状,7周后植株叶片出现边缘泛黄并略显透明的表征,这说明TRV病毒对甜菜产生了影响。提取光漂白叶片的RNA并进行PCR鉴定,发现被侵染的叶片中存在目标基因片段,说明TRV对甜菜具有一定的侵染能力,这为下一步在甜菜中建立VIGS体系奠定了基础。

4 问题与展望

尽管近几年建立在TRV上的基因沉默技术受到了人们的广泛关注,并且,目前已在多种果蔬作物上成功建立了VIGS体系,但该体系仍然存在一些问题。VIGS最大的缺陷就是基因沉默不彻底,对于一些只需积累极少量的转录本就可获得足够

蛋白质的基因, 其功能难以通过VIGS来确定; 其次是基因沉默不均一, 即植株的有些部位沉默效率高, 有些部位只有轻微的沉默表型。而且, 不同的植株间沉默水平也可能不同, 甚至有些沉默植株只在局部组织有表型, 这在基因沉默后不能产生明显表型的情况下, 不利于实验结果的分析; 另外, VIGS引起的沉默持续性差, 一般有效的沉默期在1个月左右, 此后逐渐出现沉默衰减和表型的恢复, 这对于生长周期较长的果树植物的沉默时间明显不够(Ryu等2004)。

但上述大部分问题, 可以通过设置适当的对照, 增加实验的重复, 以及对TRV病毒载体的改造等加以避免。目前, 在番茄中利用改造的TRV载体已开发出非整合可持续传代的VIGS技术体系(Senthil-Kumar和Mysore 2011)。通过该体系可使目的基因的沉默时间持续两年以上, 实现了在非遗传转化条件下鉴定番茄各发育阶段更广泛基因的功能。

因此, 虽然TRV-VIGS体系还存在很多问题, 但由TRV介导的VIGS技术具有侵染效率高、宿主范围广、引起的症状轻等诸多优势, 并随着对VIGS作用机制的进一步揭示、TRV载体的改造及VIGS体系的优化, 可以预见, 该技术将会在越来越多的果蔬作物及其他植物基因功能的研究中得到应用。

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
- Bai SL, Tuan PA, Tatsuki M, Yaegaki H, Ohmiya A, Yamamizo C, Moriguchi T (2015). Knockdown of *carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)* via virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit: evaluation of gene function related to fruit traits. *Plant Mol Biol Rep*, 34 (1): 257–264
- Becker A, Lange M (2010). VIGS—genomics goes functional. *Trends Plant Sci*, 15 (1): 1–4
- Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baulcombe DC, Baker B, Jones JDG (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J*, 39 (2): 264–272
- 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 gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol Cells*, 17 (2): 377–380
- Dohm JC, Minoche A, Holtgrawe D, Capella-Gutierrez S, Zakrzewski F, Tafer H, Rupp O, Sorensen TR, Stracke R, Reinhardt R, et al (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*, 505 (7484): 546–549
- Dong YY, Burch-Smith TM, Liu YY, Manillapalli P, Dinesh-Kumar SP (2007). A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for *NBMADS4-1* and *-2* in floral development. *Plant Physiol*, 145: 1161–1170
- Faivre-Rampent O, Gilroy EM, Hrubikova K, 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
- 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(2014). VIGS技术在甜菜上的应用. 生物信息学, 13 (1): 18–22]
- Huang CJ, Qian YJ, Li ZH, Zhou XP (2012). Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *Sci China Life Sci*, 55 (2): 99–108
- Ji NN, Min DD, Shao SJ, Li FJ, Zhang XH (2016). Progress of research on application of VIGS vectors in vegetables. *Plant Physiol J*, 52 (6): 810–816 (in Chinese with English abstract) [季娜娜, 闵德栋, 邵淑君, 李富军, 张新华(2016). VIGS载体在蔬菜作物中的应用研究进展. 植物生理学报, 52 (6): 810–816]
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol*, 157 (1): 188–199
- Kumagi MH, Dosnson J, Della CG, Harvey D, Hanley K, Grill LK (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1679–1683
- Li L, Tian SL (2015). Involvement of *Lcyb* gene in the synthesis of capsanthin. *J Mountain Agric Biol*, 34 (4): 81–84 (in Chinese with English abstract) [李莉, 田士林(2015). *Lcyb*基因与辣椒红素合成的关系. 山地农业生物学报, 34 (4): 81–84]
- Li N, Yang ML, Chen TZ, Zhang BL, Zhao TM, Yang YW, Liu TL, Yu WG (2014). Functional characterization of *CINLR* gene involved in tomato defense against tomato yellow leaf curl disease. *Acta Horticult Sin*, 41 (5): 889–897 (in Chinese with English abstract) [李楠, 杨玛丽, 陈天子, 张保龙, 赵统敏, 杨郁文, 刘廷利, 余文贵(2014). 番茄抗黄化曲叶病毒相关基因 *CINLR* 的功能分析. 园艺学报, 41 (5): 889–897]
- Li Q, Chen P, Dai S, Sun YF, Yuan B, Kai WB, Pei YL, He SH, Liang B, Zhang YS, et al (2015a). *PacCYP707A2* negatively regulates cherry fruit ripening while *PacCYP707A1* mediates drought tolerance. *J Exp Bot*, 66 (13): 3765–3774
- Li XJ, Zhang JQ, Wu ZC, Lai B, Huang XM, Qin YH, Wang HC, Hu GB (2015b). Functional characterization of a glucosyltransferase gene, *LcUFGT1*, involved in the formation of cyanidin glucoside in the pericarp of *Litchi chinensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120 (3): 1131–1138
- Liu GC (2010). Cloning and functional validation of *CPSGT1* and *CPRAR* in *Carica papaya* L (Master's thesis). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘国

- 成(2010). 番木瓜中*SGT1*、*RAR*基因的克隆及其功能验证(硕士学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- 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 YL, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002a). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30 (4): 415–429
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002b). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 31 (6): 777–786
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003). Virus-induced gene silencing in plant. *Methods*, 30 (4): 296–303
- Mei M, Huang YH, Mao ZC, Liu ZM, Xie BY (2013). Molecular clone of *MiAsg* gene and the its relationship with disease caused by *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Breed*, 11 (5): 589–591 (in Chinese with English abstract) [梅眉, 黄永红, 茆震川, 刘志敏, 谢丙炎(2013). *MiAsg*分子克隆及与南方根结线虫病的关系. 分子植物育种, 11 (5): 589–591]
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 25 (2): 237–245
- Ryu CM, Anand A, Kang L, Mysore KS (2014). Agrodrench: A novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse *Solanaceous* species. *Plant J*, 40 (2): 322–331
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10 (6): 937–946
- Senthil-Kumar M, Mysore KS (2011). Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnol J*, 9 (7): 797–806
- Senthil-Kumar M, Mysore KS (2014). Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Protoc*, 9 (7): 1549–1562
- Suzuki K, Mori M (2003). Carotenoid composition of new cultivar of *Capsicum annuum* during maturation and its high capsanthin content. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, 50 (7): 324–326
- Tian J, Cheng L, Han ZY, Yao YC (2015). Tobacco rattle virus mediated gene silencing in strawberry plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120 (3): 1131–1138
- Tian J, Pei HX, Zhang Sh, Chen JW, Chen W, Yang RY, Meng LY, You J, Gao JP, Ma N (2014). TRV-GFP: a modified *Tobacco rattle virus* vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *J Exp Bot*, 65 (1): 311–322
- Tian WH, Zhang SP (1995). Identification of tobacco rattle virus on sweet pepper (TRV-PRSM). *J Agric Univ Hebei*, 18 (4): 32–35 (in Chinese with English abstract) [田文会, 张书萍(1995). 烟草脆裂病毒甜椒环斑花叶分离物(TRV-PRSM)的鉴定. 河北农业大学学报, 18 (4): 32–35]
- 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 LH (2014). Study on the anthocyanins metabolism and the regulation of relative gene in the fruit of apple (PhD thesis). Beijing: China Agricultural University (in Chinese with English abstract) [王丽辉(2014). 苹果果皮花色苷代谢及相关基因的调控(博士学位论文). 北京: 中国农业大学]
- Wen XC, Jiang WB, Han J, Weng ML, Fang JG (2012). The effects of environmental factors and exogenous chemicals on the fruit *UFGT* gene. *Plant Physiol J*, 48 (2): 129–134 (in Chinese with English abstract) [文习成, 姜卫兵, 韩键, 翁忙玲, 房经贵(2012). 环境因子和外源化学物质对果树*UFGT*基因的影响. 植物生理学报, 48 (2): 129–134]
- Wen XH, Jiang YH, Zhou K, Ren XL (2014). Effects of virus-induced *MdHB-1* silencing on apple fruit ripening. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*, 24 (11): 113–119 (in Chinese with English abstract) [温小红, 姜永华, 周轲, 任小林(2014). VIGS诱导*MdHB-1*沉默对苹果果实成熟的影响. 西北农业学报, 24 (11): 113–119]
- Yao DQ, Zhang WW, Yuan LH, Pan JS, He HL, Cai R (2009). VIGS: the revolution of plant function genomics research. *Mol Plant Breed*, 7 (1): 155–161 (in Chinese with English abstract) [姚丹青, 张微微, 原丽华, 潘俊松, 何欢乐, 蔡润(2009). VIGS: 植物功能基因组学研究中的革命. 分子植物育种, 7 (1): 155–161]
- Zhang L, Zhu LX, Xu C (2015). The effect of silencing chalcone synthase on anthocyanin metabolism in peach. *Acta Hort Sin*, 42 (1): 31–37 (in Chinese with English abstract) [张蕾, 朱立新, 徐川(2015). 查尔酮合酶基因对桃果实花色苷代谢的影响. 园艺学报, 42 (1): 31–37]
- Zhang QY (2014). Studies on the role of strawberry *BAG6* gene in resistance to *C. gloeosporioides* infection (Master's thesis). Taiyuan: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (in Chinese with English abstract) [张庆雨(2014). 草莓*BAG6*基因在植物炭疽病抗性中的作用研究(硕士学位论文). 太原: 西北农林科技大学]
- 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 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). 菘蓝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 HW, 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, Qin DX, Chen YH, Lian Y (2015). VIGS expression vector construction and expression analyses of *SmMsrA* gene in eggplant. *Acta Hort 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, Sun JD, Zhao Z, Lv J, Wei XW, Cai R, Xu HW (2012). The

feasibility analysis of PVX and TRV vectors as the VIGS tool
for studying the gene function. Phys Procedia, 33: 46–54

The application of TRV-mediated VIGS technique in the study of gene function in fruits and vegetables

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

School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) is a recently developed reverse genetics tool for gene function analysis in diverse plant species. The technology is limited by the host range of the virus upon which the viral vector is based; therefore, the development of viral vector has always been concerned. Compared with other viruses that have been developed as VIGS vectors, TRV vectors are used in a broad host range with high silencing efficiency and can silence genes in most plant parts. Moreover, the overall symptoms of infection by TRV are very mild compared with other viruses. Therefore, the TRV-based VIGS technology has been successfully used to study the genes function in various fruits and vegetables. In this manuscript, we describe the features of TRV vector, mechanisms of TRV-VIGS and its application to gene function analysis in fruits and vegetables. Meanwhile, the problems and its solutions of the application of TRV-VIGS in fruits and vegetables were analyzed.

Key words: virus-induced gene silencing; *Tobacco rattle virus*; fruit and vegetable; gene function

Received 2016-09-18 Accepted 2016-12-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31201432 and 31101587).

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