

# 病毒诱导的基因沉默

张洪义, 包满珠, 何燕红

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS), 是一种基于植物抗病毒防御机制开发的技术。从 VIGS 技术的发展历程、作用机制、所涉及的常规实验程序、优缺点、基因功能研究中的应用和未来研究方向等方面, 对 VIGS 技术进行综述, 以期在植物基因功能鉴定和新基因发现中为他人研究提供参考。

**关键词:** 园林植物学; 病毒诱导的基因沉默; 综述; 机制; 基因功能分析

中图分类号: Q939.46 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)09-0968-10

## Virus-induced gene silencing

ZHANG Hongyi, BAO Manzhu, HE Yanhong

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Virus-induced gene silencing (VIGS) is a technology that exploits an antiviral defense mechanism. We summarized VIGS ranging from the development, the routine experiment procedure, the merit and demerit, the recent application in functional genomics studies to a few possible research direction in order to provide references for peers in plant gene functional analysis and new gene searching.

**Key words:** garden botany; virus-induced gene silencing; review; mechanism; gene function analysis

## 0 引言

VIGS 技术是一种基于植物抗病毒侵染的自然机制所开发的研究基因功能的新工具, 即将植物目的基因片段插入到病毒载体上, 构建含有目的基因片段的重组病毒载体用于植物侵染, 使植物内源基因的表达受到抑制, 根据植物表型变化及分子水平鉴定, 进而阐明植物目的基因的功能。因其具有快速、高通量等优点, VIGS 技术为寻找新基因及研究基因功能开辟了一条快捷、高效的途径。目前, VIGS 技术广泛应用于植物功能基因的研究中, 在植物病理、逆境胁迫、生长发育、代谢途径和信号传导等生物学领域中扮演着重要角色。

## 1 VIGS 技术的发展历程

早在 20 世纪 20 年代, 人们发现植物病毒之间存在“交叉保护作用”现象, 但并未对其作出合理解释<sup>[1]</sup>。20 世纪末的研究发现, 植物的“交叉保护作用”和“恢复”现象是因为转基因和病毒基因发生转录后基因沉默 (post-transcription gene silencing, PTGS), 功能基因表达受到抑制<sup>[2]</sup>。1990 年, NAPOLI 等<sup>[3]</sup>和 van

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20120146120034)

作者简介: 张洪义 (1988—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 园林植物遗传育种

通信联系人: 何燕红, 讲师, 主要研究方向: 园林植物遗传育种. E-mail: hyh2010@mail.hzau.edu.cn

der KROL 等<sup>[4]</sup>在研究矮牵牛时发现的共抑制现象 (co-suppression) 就是典型的转录后基因沉默现象。

1995 年, KUMAGAI 等<sup>[5]</sup>将烟草八氢番茄红素合成酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因的 cDNA 片段插入烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 基因组中, 将重组的病毒载体侵染烟草, 致使烟草 (*Nicotiana tabacum*) 产生白化现象。通过检测 PDS 的表达量, 发现 PDS mRNA 含量降低, 揭示了类胡萝卜素合成途径中的内源基因 PDS 被沉默致使烟草产生白化现象。1998 年, MONTGOMERY 等<sup>[6]</sup>和 FIRE 等<sup>[7]</sup>对秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的研究证明了 RNA 沉默发生于转录之后, 由双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 引起, 并第一次提出 RNA 干涉 (RNA-interference, RNAi) 的概念。RNAi 的研究揭示了 VIGS 机制, 并促进了 VIGS 技术在植物功能基因研究中的应用。

VIGS 机制深入研究的同时, 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功能基因的研究而展开。目前常用的 VIGS 病毒载体主要分为 3 类: RNA 病毒载体、DNA 病毒载体和卫星病毒载体。

RNA 病毒载体应用较多, 如以马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX)、烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV)、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)、杨树花叶病毒 (poplar mosaic virus, PopMV)、番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus, TBSV)、大麦条纹花叶病毒 (barley stripe mosaic virus, BSMV)、菜豆荚斑驳病毒 (bean pod mottle virus, BPMV) 和雀麦花叶病毒 (brome mosaic virus, BMV) 等为基础进行改造而获得大量 VIGS 载体<sup>[1]</sup>。以 TRV 为基础改造而来的病毒载体版本较多并且应用较为广泛, 已在茄科、毛茛科、菊科和十字花科等植物基因功能研究中发挥着重要作用。

与 RNA 病毒类 VIGS 载体相比, DNA 病毒类 VIGS 载体的优点是构建简单、无需转录、稳定、易于操作, 但其沉默效果不如 RNA 病毒类 VIGS 载体。番茄金花叶病毒 (tomato golden mosaic virus, TGMV)、甘蓝曲叶病毒 (cabbage leaf curl virus, CBLCV) 和非洲木薯花叶病毒 (African cassava mosaic virus, ACMV) 等 DNA 病毒类 VIGS 载体应用在植物基因功能研究中。

卫星病毒自身基因组小, 载体构建操作相对容易, 且对高温不敏感, 适用于维管束组织特异性表达基因的 VIGS 分析<sup>[8-9]</sup>。GOSSELE 等<sup>[10]</sup>在 TMV U2 的卫星病毒 (satellite tobacco mosaic virus, STMV) 的基础上首次在烟草中建立了卫星 VIGS 体系。TAO 等<sup>[11]</sup>在对中国番茄黄曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV) 进行研究时开发了 DNA 卫星病毒载体, 并在茄科植物中得到成功应用。

此外, 人工合成的微小 RNA (microRNA, miRNA) 介导的 VIGS 也在烟草中得到成功应用<sup>[12-14]</sup>。人们对植物和病毒相互作用机制的深层研究, 推动了 VIGS 技术作为重要的反向遗传学研究工具在植物基因功能研究中的应用进程。

## 2 VIGS 作用机制

在病毒侵染时, 植物会启动其自身的抗病毒防御机制, 此机制主要针对病毒的基因组, 这便是 VIGS 的基础。经过改造的含有植物内源基因片段的病毒载体侵染植物后, 宿主便启动 PTGS, 以载体所含有的目的基因为目标并抑制该宿主此内源基因功能的发挥<sup>[15]</sup>。宿主细胞通过启动 PTGS 发挥防御机制以应对病毒侵染<sup>[16-17]</sup>。转录后基因沉默机制如图 1 所示<sup>[18]</sup>。

病毒的转录产物形成大量 dsRNA, 这些双链结构是通过自我组装或者病毒的正义链和反义链所对应的单链核糖核酸互补所形成。dsRNA 的形成依赖 RNA 引导的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerases, RdRp), DNA 病毒没有 RdRp, 需依赖宿主本身的 RdRp; 而 RNA 病毒载体却可以依赖自身的 RdRp 完成, 而不依赖宿主的 RNA 聚合酶。dsRNA 被 Dicer-like (DCL) 酶切割形成 21~24 个核苷

酸的小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA), siRNA 作为 VIGS 促发因子以单链形式与 Argonaute (AGO) RNA 结合蛋白以及其他 RNase 结合, 形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC), RISC 复合物能够特异地引起含有与 siRNA 同源序列的 mRNA 降解。siRNA 的反义链与 RNA 诱导基因沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合, 特异性识别细胞质中目的基因的单链 mRNA, 造成目的基因 mRNA 特异性降解, 从而导致目的基因在 RNA 水平上发生沉默。带有 siRNA 的 RISC 特异地识别与 siRNA 高度同源的 mRNA 序列, 并以 mRNA 为模板, siRNA 为引物在 RNA 聚合酶的作用下合成 dsRNA, 此 dsRNA 在下一个循环中被降解掉, 呈现出级联放大效应<sup>[19]</sup>。

VIGS 引起植物内源基因表达受到抑制。VIGS 通常在成功接种 3~4 周即可出现表型, 一个月之后基因功能沉默减弱, 因此 VIGS 是一种瞬时性的沉默<sup>[20]</sup>。

### 3 VIGS 技术的常规操作程序

#### 3.1 载体的构建

高效合理的 VIGS 载体, 需要考虑病毒载体的种类、宿主种类、目的基因片段大小以及基因片段保守性等因素。

不同病毒载体在不同植物中接种效果不同, 沉默效果亦不同。

理论上所插入的目的基因片段长度至少为 23 bp, 但以 200~500 bp 为宜。插入的基因片段太大, 可能会引起基因片段丢失或载体运动困难<sup>[16]</sup>; 插入片段太小, 可能会影响到 dsRNA 的数量, 进而影响基因沉默效率。

选择正确的目的基因片段是确保基因沉默的关键因素。单拷贝的基因, 可以选择阅读框里的任何区段; 研究基因家族中的单个基因, 须保证所选择的区段不能与基因家族内其他成员存在长度多于 23 bp 的一致序列; 研究基因家族内的多个基因, 可以选择基因家族保守区段<sup>[16-17]</sup>。在研究家族基因时, VIGS 技术可以克服基因功能冗余, 使其成为基因家族中功能基因研究的重要工具。

内源基因片段的插入方向也是影响基因沉默效率的重要因素。一般基因片段反向插入比正向插入诱导的基因沉默效率略高<sup>[21]</sup>, 但某些病毒载体中, 目的基因片段的插入方向并不会对基因的沉默效果产生太大影响<sup>[22]</sup>。另外, 插入的目的基因片段形成发夹结构亦可提高基因沉默效率<sup>[23]</sup>。

VIGS 载体中同时插入多个基因片段, 可达到多个基因共沉默效果<sup>[24]</sup>, 但需考虑插入基因片段总长度, 总长度不宜超过 1.5 kb<sup>[16]</sup>。

#### 3.2 侵染接种处理

宿主和病毒载体的种类、接种部位、接种时期和接种处理方法, 是影响接种成功率和基因沉默效率

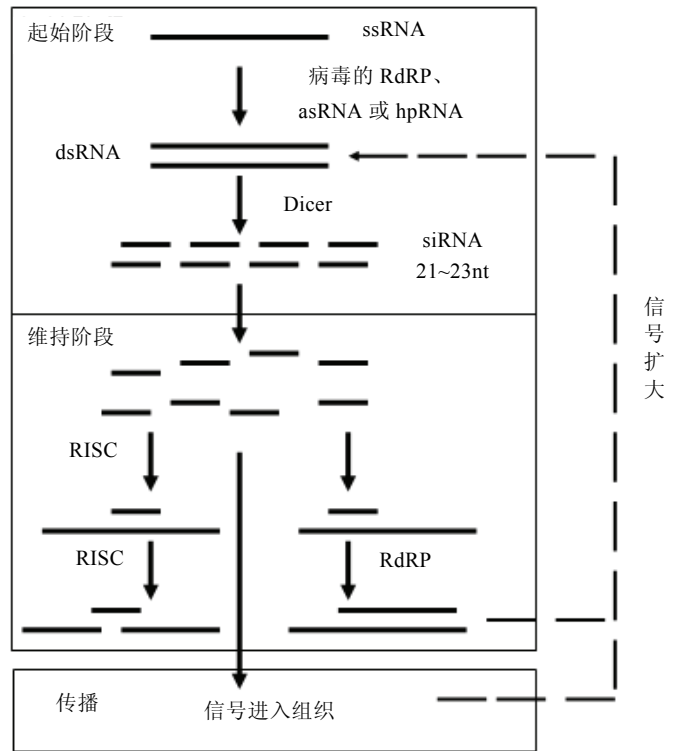


图 1 转录后基因沉默机制<sup>[18]</sup>

Fig.1 Mechanism of post-transcription gene silencing<sup>[18]</sup>

的重要因素。

通常采用农杆菌介导的侵染接种, 主要有针筒注射渗透<sup>[25]</sup>、灌根<sup>[26]</sup>、高压喷射<sup>[27]</sup>和真空渗透<sup>[28]</sup>等方法。除此之外, RNA 病毒载体的体外转录物可采用机械接种的方法, 如石英砂处理或者牙签刺伤<sup>[29]</sup>; DNA 病毒载体可采用基因枪(微粒轰击)转化的方法<sup>[20]</sup>。幼苗时期, 选用渗透处理的方法, 工作量小、节省时间、效果好; 叶片可以采用无针头注射器注射渗透处理; 对顶端生长部位如花和果实等, 多采用注射处理。利用 VIGS 技术研究具有表达时空差异的功能基因时, 基因沉默最佳时期和宿主目的基因表达时期是否一致也会影响沉默效果。

### 3.3 基因沉默效果的检测与评价

首先, 通过表型观测进行初步鉴定。为研究方便, 可以构建含有 PDS 或绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 报告基因片段的 VIGS 载体, 借助植物白化效应或荧光效应, 初步鉴定转化效果<sup>[30-32]</sup>。

其次, 分子水平的检测。分子水平的检测可确定成功转化的植株。1) 在接种后的早期, 通过 PCR 检测确定是否侵染成功。为避免扩增出病毒自身的基因片段序列, 引物应选择目的基因和病毒载体上各一条。2) 在合适时期对基因沉默部位, 进行半定量 PCR 或者定量 PCR 检测, 以宿主中组成型表达的基因为参照, 检测目的基因的表达情况<sup>[24,33]</sup>。

最后, 对转化成功的植株进行生理生化指标检测, 确定目的基因的功能以便进行深层研究。另外, VIGS 体系建立与优化时, 需统计分析植株基因沉默的效率和程度, 以优化沉默条件。

## 4 VIGS 技术的优缺点

### 4.1 VIGS 技术的优点

VIGS 技术可对植物目的基因的特异性负向调控, 使植物表型缺失。与传统的基因功能研究方法如化学诱变、T-DNA 插入和转座子插入突变等方法相比, VIGS 技术具有不需要基因全长、周期短、成本低、工作量小、高通量、不依赖成熟的转基因体系和重复性较高等优点<sup>[16]</sup>。

1) 不需要基因全长, 可以在全长序列未知的情况下寻找新基因并研究其功能。利用以芜菁黄花叶病毒(turnip yellow mosaic virus, TYMV)为基础开发的病毒载体, 载体中含有 76 bp 目的基因片段时即可在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的叶片、茎、花和分生组织中引发有效的基因沉默<sup>[34]</sup>。

2) 周期短, 见效快, 高通量。可不需要稳定的遗传转化和组织培养, 通常在成功接种处理后 2~3 周即可达到沉默效果, 因而可在较短时间内完成高通量的基因筛选和基因功能研究。

3) 研究基因家族的功能。通过构建含有基因家族保守序列区段的 VIGS 载体, 可同时沉默整个基因家族的基因, 为研究家族基因提供了方便; 此外, 通过选择特定序列构建载体, 可研究基因家族的单拷贝和多拷贝基因。且鉴于多倍体植物中含有 85%一致性基因, VIGS 技术在多倍体植物研究中亦有着广阔的应用前景。

4) 研究基因范围更广。对植物早期生长发育、分生组织及具有致死性的突变体进行研究, VIGS 具有一定的优势<sup>[35]</sup>, 如研究致死基因功能可以采用 VIGS 技术对成熟期的植物进行诱导并产生表型突变, 从而阐明其功能。

### 4.2 VIGS 技术的缺点

VIGS 技术虽与传统的基因功能研究方法相比有诸多优点, 但仍存在许多缺点, 并限制了 VIGS 技术的应用。

1) 缺少合适的 VIGS 载体。病毒载体种类会直接影响接种侵染和基因沉默的效率<sup>[35]</sup>。最初的 VIGS



载体主要应用在拟南芥、本氏烟草、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 及辣椒 (*Capsicum annuum*) 等植物中。目前, 虽初步开发改造出应用于豌豆 (*Pisum sativum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、大豆 (*Glycine max*)、大麦 (*Hordeum vulgare*) 等植物上的新型病毒载体, 但病毒载体的种类仍有限, 无法满足 VIGS 技术的广泛应用。

2) 存在基因“脱靶”现象<sup>[36]</sup>。如果目的基因片段选择不合理, siRNA 可能与非靶基因结合而导致非靶标基因沉默。选择目的基因片段需要精确, 确定沉默症状是否为非靶标基因沉默所致, 以确保研究结论可靠。

3) 处理方法选择与菌液浓度控制。合理的处理方法要求在达到有效接种量时, 对植物伤害尽可能的小。接种物含量会影响植物的正常生长和沉默效率: 含量太低会导致接种效率低, 甚至无法达到基因沉默的效果; 含量太高, 可能会引起病毒致病症状, 造成植物组织损伤, 影响植物正常生长。

4) 环境条件控制困难。植物生长环境(温度和湿度)会影响接种和基因沉默效率。温度影响 siRNA 的形成<sup>[37]</sup>, 进而影响基因沉默效率。较低的湿度可以使基因沉默维持较长时间, 但不利于植物正常生长。

5) 难以达到彻底抑制基因表达的效果。对于极少量表达即可实现基因功能的目的基因, 运用 VIGS 技术可能难以达到预期效果。

6) 病毒载体致病症状的干扰。有些病毒载体对宿主可能会产生影响, 如产生致病症状或者影响植物正常生长。需设置阴性对照、空载对照和阳性对照, 以排除病毒载体本身引起干扰<sup>[36]</sup>。

## 5 VIGS 技术在基因功能研究中的应用现状

在后基因组时代, 大量基因组全长序列和表达序列标签的获得, 为新基因发现与基因功能研究提供了大量信息<sup>[20,36,38-39]</sup>, 为 VIGS 技术开辟了广阔的应用空间。目前, 已在多种植物中建立了相应的 VIGS 体系。最近研究的植物主要有茄科<sup>[40-42]</sup>、十字花科<sup>[43-44]</sup>、禾本科<sup>[45-48]</sup>、毛茛科<sup>[49]</sup>、菊科<sup>[32]</sup>、豆科<sup>[50-52]</sup>、兰科<sup>[53-54]</sup>、姜科<sup>[55]</sup>、罂粟科<sup>[56]</sup>和锦葵科<sup>[57-58]</sup>植物。目前, VIGS 技术在基因功能的研究范围广泛, 涉及植物形态发育、代谢途径、信号传导、逆境胁迫及细胞程序性死亡等方面。

### 5.1 植物形态发育

利用 VIGS 技术进行植物生长发育相关的研究, 主要集中在叶片形态发育、花器官的形态建成及果实的成熟与开裂等方面。利用 VIGS 技术揭示了 *TaBTF3* 基因对小麦植株叶肉细胞结构的影响, 在小麦幼苗的生长发育过程中发挥着重要作用<sup>[48]</sup>。利用 VIGS 技术研究本氏烟草的染色体甲基化酶 3(*NbCMT3*) 功能, 发现 *NbCMT3* 基因影响叶片栅栏细胞的形成, 从而影响叶片形态发育<sup>[59]</sup>。FOURQUIN 等<sup>[24]</sup>利用 VIGS 技术对本氏烟草的 *AGAMOUS* 类基因进行研究, 揭示了 *AG* 和 *SHP* 基因在花器官形态建成与果实开裂中的重要作用。HSIEH 等<sup>[54]</sup>运用 VIGS 技术研究了小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 中与花器官形态建成相关的 5 个转录因子的功能, 并阐明了兰花花器官形态建成中两类 MADS-box 转录因子的相互作用。STAMMLER 等<sup>[60]</sup>运用 VIGS 技术研究了花菱草 (*Eschscholzia californica*) 中多拷贝 *STM-like KNOX1* 基因在花分生组织中的作用, 揭示了 *EcSTM1* 和 *EcSTM2* 在花器官形成中的重要作用。另外, SUN 等<sup>[61]</sup>利用 VIGS 技术研究了乙烯在草莓 (*Fragaria ananassa*) 果实开裂中的作用。宋伟杰等<sup>[62]</sup>利用 VIGS 技术揭示豌豆 *PsPI* 基因具有拟南芥 *PII*/金鱼草 *GLO* 同源基因的功能, 并说明这类基因在进化和功能上相当保守。

### 5.2 植物抗病虫与逆境胁迫

目前, 利用 VIGS 技术与植物抗病虫能力相关的功能基因, 是植物与病虫相互作用研究的热点。

运用 VIGS 技术研究小麦 (*Triticum aestivum*) *TaEIL1* 和 *TaLSD1* 基因, 发现该基因在小麦与小麦条锈病真菌互作中起到负向调控作用<sup>[63-64]</sup>。利用 VIGS 技术研究番茄受体类激酶体胚受体激酶 1 (SEPK1) 功能, 发现 SEPK1 是抵抗马铃薯蚜的必需物质<sup>[65]</sup>。利用 VIGS 技术抑制棉花中的 *GhNDR1* 和 *GhMCK2* 基因表达导致棉花对黄萎病的抵抗能力下降<sup>[58]</sup>。利用 VIGS 技术沉默棉子酚合成酶基因 (*GbCAD1*), 导致棉花对黄萎病菌的抗性降低<sup>[66]</sup>。海岛棉 (*Gossypium barbadense*) 和枯萎病的互作研究也应用了 VIGS 技术<sup>[57]</sup>。GANIGER 等<sup>[50]</sup>运用 VIGS 技术对大豆和大豆锈菌互作相关蛋白进行了鉴定。

VIGS 技术也广泛应用于植物逆境胁迫研究。抑制大豆 *GmRPA3* 基因表达, 叶片叶绿素含量降低, 植株生长缓慢, 表明 *GmRPA3* 的正常表达有利于铁元素的吸收利用<sup>[51]</sup>。利用 VIGS 技术证实小麦中的 *Eral1*, *Cyp707a* 和 *Sall1* 同源基因与小麦抗旱能力相关<sup>[67]</sup>。利用 VIGS 技术证实辣椒中过氧化物酶 (CanPOD) 是与辣椒疫霉病抗性、非生物胁迫、局部及系统性的细胞死亡相关的重要物质<sup>[68]</sup>。

### 5.3 代谢途径与信号传导

VIGS 技术可以通过破坏代谢途径中酶的合成从而阐明植物代谢机理。运用 VIGS 技术在研究了番茄红素合成途径<sup>[69]</sup>、罂粟 (*Papaver somniferum*) 中吗啡生物合成途径<sup>[56]</sup>、长春花 (*Catharanthus roseus*) 中环烯醚萜类化合物和单萜吲哚生物碱代谢途径<sup>[70]</sup>和草莓 (*F. ananassa*) 中乙烯合成途径<sup>[61]</sup>。利用 VIGS 技术沉默拟南芥 *ML3* 基因, 发现茉莉酸和水杨酸信号物质发生变化, 说明了 *ML3* 在依赖于茉莉酸和水杨酸相关响应中有着重要作用<sup>[43]</sup>。

### 5.4 细胞程序化死亡

通过 VIGS 技术已经成功地解析植物细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 反应, 并揭示在 PCD 中所沉默基因的产物在其他反应体系中是重要的调节元件。XU 等<sup>[71]</sup>利用 VIGS 技术揭示, 内质网腔蛋白受体 ERD2a 和 ERD2b 影响植物先天性免疫反应中的过敏反应引起的程序化细胞死亡 (hypersensitive response-PCD, HR-PCD)。运用 VIGS 技术对小麦中 *TaLSD1* 基因的研究表明, *TaLSD1* 是细胞程序化死亡的重要负向调控因子<sup>[64]</sup>。

## 6 结论与展望

在 DNA 测序实现了高通量、低成本核酸序列测定时, 生命科学领域实现了多学科的交叉融合<sup>[39]</sup>, 如何快速确定大量基于 DNA 的核酸序列的功能, 成为后基因组时代中生命科学所面临的一大挑战。VIGS 技术成功解决了这一难题, 成为快速、高通量地研究植物基因功能的重要工具<sup>[20]</sup>。VIGS 技术虽得到一定的应用, 但仍需深层次研究与完善。

### 6.1 获得稳定可遗传性状

由于 VIGS 通常存在恢复现象, 如何通过 VIGS 技术获得稳定可遗传的后代, 成为 VIGS 技术的研究热点。病毒载体可以引起 DNA 甲基化进而导致转录水平的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS), 源于 dsRNA 的 siRNA 可以使基因的启动子甲基化, 从而致使基因在转录水平发生沉默<sup>[36]</sup>。目前已有研究证明, 由于 siRNA 对内源基因启动子的作用所导致的表型变化可以遗传。通过瞬时的基因沉默致使植物基因组的永久性改变, 从而获得具有稳定性状的后代<sup>[36,40,72]</sup>。KANAZAWA 等<sup>[73]</sup>以黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 为基础改造的载体, 在矮牵牛和番茄中均实现可遗传的内源基因沉默。MARTON 等<sup>[74]</sup>对锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 技术进行研究时, 运用携带有 *ZFN* 片段的烟草脆裂病毒载体进行基因沉默, 序列分析和突变表型的遗传都证实基因发生稳定性改变。目前, 利用 VIGS 技术获得稳定可遗传性状的研究仍较少, 其在生物学领域中具有巨大的开发应用潜力, 仍需做深层研究。

## 6.2 病毒沉默抑制机制

VIGS 是植物和真菌等生物的一种抗病毒防御机制。宿主通过基因沉默抑制寄主基因的表达,与此同时,病毒也会通过产生抑制子蛋白对宿主基因沉默进行抑制,从而使病毒与植物之间为了生存展开斗争<sup>[75]</sup>。在植物和病毒相互作用的过程中,两者之间存在着防御、反防御的复杂斗争关系。寄主的 RNA 沉默机制和病毒编码沉默抑制子就是防御一反防御斗争的典型<sup>[76]</sup>。病毒编码 RNA 沉默抑制子是病毒应对植物抗病毒防御机制的关键因子<sup>[77]</sup>。病毒抑制子蛋白的研究可以更好地揭示病毒在宿主细胞内的积累与转移、病毒与宿主之间相互作用等机理,同时为病毒诱导的基因沉默技术的应用提供理论依据。目前研究较多的病毒抑制子蛋白主要有 2b, HC-Pro 和 p1 3 种。

## 6.3 基因沉默效率

基因沉默效率会影响 VIGS 技术的成功应用。病毒载体的开发与改造、病毒载体的转移、沉默时间等均是病毒诱导的基因沉默技术应用中仍需要深层研究探索的问题。

## [参考文献] (References)

- [1] 徐幼平, 徐秋芳, 宋晓毅, 等. 病毒诱导的基因沉默[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 34 (2): 119-131. XU Y P, XU Q F, SONG X Y, et al. Virus-induced gene silencing[J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science, 2008, 34(2):119-131. (in Chinese)
- [2] 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.
- [3] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in irreversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. The Plant Cell, 1990, 2(4): 279-289.
- [4] van der KROL A R, MUR L A, BELD M, et al. Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. The Plant Cell, 1990, 2(4): 291-299.
- [5] KUMAGAI M H, DONSON J, DELLA-CIOPPA G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(5): 1679-1683.
- [6] MONTGOMERY M K, XU S, FIRE A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(26): 15502-15507.
- [7] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(19): 806-811.
- [8] XU Y P, ZHENG L P, XU Q F, et al. Efficiency for gene silencing induction in *Nicotiana* species by a viral satellite DNA vector[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(12): 1726-1733.
- [9] CAI X Z, WANG C C, XU Y, et al. Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector[J]. Virus Research, 2007, 125(2): 169-175.
- [10] 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(5): 859-866.
- [11] TAO X R, ZHOU X P. Pathogenicity of a naturally occurring recombinant DNA satellite associated with tomato yellow leaf curl China virus[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(1): 306-311.
- [12] 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.
- [13] FELIPPES F F, WANG J W, WEIGEL D. MIGS: miRNA-induced gene silencing[J]. Plant Journal, 2012, 70(3): 541-547.
- [14] SHA A H, ZHAO J P, YIN K Q, et al. Virus-based microRNA silencing in plants[J]. Plant Physiology, 2014, 164(1): 36-47.
- [15] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants[J]. Nature, 2004, 431(16): 356-363.
- [16] 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]. *Plant Journal*, 2004, 39(5): 734-746.
- [17] LU R, MARTIN-HERNANDEZ A M, PEART J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants[J]. *Methods*, 2003, 30(4): 296-303.
- [18] BENEDITO V A, VISSER P B, ANGENENT G C, et al. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2004, 3(3): 323-341.
- [19] WATERHOUSE P M, HELLIWELL C A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(1): 29-38.
- [20] BECKER A, LANGE M. VIGS-genomics goes functional[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(1): 1-4.
- [21] HUANG C J, QIAN Y J, LI Z H, et al. Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics[J]. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(2): 99-108.
- [22] TAO X R, ZHOU X P. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants[J]. *Plant Journal*, 2004, 38(5): 850-860.
- [23] LACOMME C, HRUBIKOVA K, HEIN I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats[J]. *Plant Journal*, 2003, 34(4): 543-553.
- [24] FOURQUIN C, FERRANDIZ C. Functional analyses of AGAMOUS family members in *Nicotiana benthamiana* clarify the evolution of early and late roles of C-function genes in eudicots[J]. *Plant Journal*, 2012, 71(6): 990-1001.
- [25] HUANG Y H, MEI M, MAO Z C, et al. Molecular cloning and virus-induced gene silencing of MiASB in the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2014, 138(1): 181-193.
- [26] 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*, 2004, 40(2): 322-331.
- [27] LIU Y, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. *Plant Journal*, 2002, 31(6): 777-786.
- [28] YAN H X, FU D Q, ZHU B Z, et al. Sprout vacuum-infiltration: a simple and efficient agroinoculation method for virus-induced gene silencing in diverse solanaceous species[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9): 1713-1722.
- [29] LU R, MALCUIT I, MOFFETT P, et al. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance[J]. *Embo. Journal*, 2003, 22(21): 5690-5699.
- [30] TIAN J, PEI H X, ZHANG S, et al. TRV-GFP: a modified tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 65(1): 311-322.
- [31] QUADRANA L, RODRIGUEZ M C, LOPEZ M, et al. Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in *Arabidopsis* and across all stages of tomato fruit development[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 1278-1291.
- [32] DENG X B, ELOMAA P, NGUYEN C X, et al. Virus-induced gene silencing for Asteraceae: a reverse genetics approach for functional genomics in *Gerbera hybrida*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(8): 970-978.
- [33] LI Q, FAN C M, ZHANG X M, et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(10): 1789-1798.
- [34] PFLIEGER S, BLANCHET S, CAMBORDE L, et al. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* using a "one-step" TYMV-derived vector[J]. *Plant Journal*, 2008, 56(4): 678-690.
- [35] 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.
- [36] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(12): 656-665.
- [37] ZHONG S H, LIU J Z, JIN H, et al. Warm temperatures induce trans C by inhibiting siRNA biogenesis in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(22): 9171-9176.
- [38] SAHU P P, PURANIK S, KHAN M, et al. Recent advances in tomato functional genomics: utilization of VIGS[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(4): 1017-1027.



- [39] ZHOU X G, REN L F, LI Y T, et al. The next-generation sequencing technology: a technology review and future perspective[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(1): 44-57.
- [40] 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[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(7): 797-806.
- [41] WANG J E, LI D W, GONG Z H, et al. Optimization of virus-induced gene silencing in pepper (*Capsicum annuum* L.)(J). *Genetics and Molecular Research*, 2013,12(3): 2492-2506.
- [42] LIU H P, FU D Q, ZHU B Z, et al. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*)[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(6): 422-429.
- [43] FRIDBORG I, JOHANSSON A, LAGENSJO J, et al. ML3: a novel regulator of herbivory-induced responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(4): 935-948.
- [44] WANG P, ZHANG J, SU J B, et al. The chloroplast min system functions differentially in two specific nongreen plastids in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e71190.
- [45] SCOFIELD S R, NELSON R S. Resources for virus-induced gene silencing in the grasses[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(1): 152-157.
- [46] BENNYPAUL H S, MUTTI J S, RUSTGI S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2012, 12(1): 143-156.
- [47] MARTIN R C, GLOVER-CUTTER K, MARTIN R R, et al. Virus induced gene silencing in *Lolium temulentum*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, 113(2): 163-171.
- [48] KANG G Z, LI G Z, MA H Z, et al. Proteomic analysis on the leaves of TaBTF3 gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 83, 130-143.
- [49] DI STILIO V S, KUMAR R A, ODDONE A M, et al. Virus-induced gene silencing as a tool for comparative functional studies in *Thalictrum*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12064.
- [50] GANIGER M, RARUANG Y, WALKER D R, et al. VIGS study of proteins identified in soybean and *Phakopsora pachyrhizi* interaction[J]. *Phytopathology*, 2013, 103(5): 4.
- [51] ATWOOD S E, O'ROURKE J A, PEIFFE G A, et al. Replication protein a subunit 3 and the iron efficiency response in soybean[J]. *Plant Cell Environ.*, 2014, 37(1): 213-234.
- [52] CONSTANTIN G D, KRATH B N, MACFARLANE S A, et al. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species[J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(4): 622-631.
- [53] HSIEH M H, LU H C, PAN Z J, et al. Optimizing virus-induced gene silencing efficiency with *Cymbidium* mosaic virus in *Phalaenopsis* flower[J]. *Plant Science*, 2013, 201: 25-41.
- [54] HSIEH M H, PAN Z J, LAI P H, et al. Virus-induced gene silencing unravels multiple transcription factors involved in floral growth and development in *Phalaenopsis* orchids[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(12): 3869-3884.
- [55] RENNER T, BRAGG J, DRISCOLL H E, et al. Virus-induced gene silencing in the culinary ginger (*Zingiber officinale*): an effective mechanism for down-regulating gene expression in tropical monocots[J]. *Molecular Plant*, 2009, 2(5): 1084-1094.
- [56] WIJEKOON C P, FACCHINI P J. Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing[J]. *Plant Journal*, 2012, 69(6): 1052-1063.
- [57] PANG J H, ZHU Y, LI Q, et al. Development of *Agrobacterium*-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in *Gossypium barbadense*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73211.
- [58] GAO X Q, WHEELER T, LI Z H, et al. Silencing GhNDR1 and GhMKK2 compromises cotton resistance to verticillium wilt[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(2): 293-305.
- [59] HOU P Q, LEE Y I, HSU K T, et al. Functional characterization of *Nicotiana benthamiana* chromomethylase 3 in developmental programs by virus-induced gene silencing[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 150(1): 119-132.
- [60] STAMMLER A, MEYER S S, PLANT A R, et al. Duplicated *STM-like KNOX I* genes act in floral meristem activity in *Eschscholzia californica* (Papaveraceae)[J]. *Development Genes and Evolution*, 2013, 223(5): 289-301.

- [61] SUN J H, LUO J J, TIAN L, et al. New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2013, 32(3): 461-470.
- [62] 宋伟杰, 王峥, 王利淋. 利用病毒诱导的基因沉默技术研究一个豌豆 PI 同源基因的功能[J]. *科学通报* 2007, 52(14): 1644- 649.
- SONG W J, WANG Z, WANG L L. Functional characterization of the PI homologous genes *PsPI* in *Pisum sativum* by virus-induced gene silencing[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(14): 1644-1649. (in Chinese)
- [63] DUAN X Y, WANG X J, FU Y P, et al. TaEIL1, a wheat homologue of AtEIN3, acts as a negative regulator in the wheat-stripe rust fungus interaction[J]. *Mol. Plant Pathol.*, 2013, 14(7): 728-739.
- [64] GUO J, BAI P F, YANG Q, et al. Wheat zinc finger protein TaLSD1, a negative regulator of programmed cell death, is involved in wheat resistance against stripe rust fungus[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 164-172.
- [65] MANTELIN S, PENG H C, LI B B, et al. The receptor-like kinase SISRK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato[J]. *Plant Journal*, 2011, 67(3): 459-471.
- [66] GAO W, LONG L, ZHU L F, et al. Proteomic and virus-induced gene silencing (VIGS) analyses reveal that gossypol, brassinosteroids, and jasmonic acid contribute to the resistance of cotton to *Verticillium dahliae*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(12): 3690-3703.
- [67] MANMATHAN H, SHANER D, SNELLING J, et al. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(5): 1381-1392.
- [68] WANG J E, LI D W, ZHANG Y L, et al. A novel peroxidase canPOD gene of pepper is involved in defense responses to *Phytophthora capsici* infection as well as abiotic stress tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(2): 3158-3177.
- [69] FANTINI E, FALCONE G, FRUSCIANTE S, et al. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 986-998.
- [70] SALIM V, YU F, ALTAREJOS J, et al. Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(5): 754-765.
- [71] XU G Y, LI S Z, XIE K, et al. Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity[J]. *The Plant Journal*, 2012, 72(1): 57-69.
- [72] VAINSTEIN A, MARTON I, ZUKER A, et al. Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(8): 363-369.
- [73] KANAZAWA A, INABA J, SHIMURA H, et al. Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants[J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(1): 156-168.
- [74] MARTON I, ZUKER A, SHKLARMAN E, et al. Nontransgenic genome modification in plant cells[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(3): 1079-1087.
- [75] INCARBONE M, DUNOYER P. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(7): 382-392.
- [76] DUAN C G, FANG Y Y, ZHOU B J, et al. Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the cucumber mosaic virus 2b protein[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(1): 259-274.
- [77] SHUKLA R, DALAL S, MALATHI V G. Suppressors of RNA silencing encoded by tomato leaf curl betasatellites[J]. *Journal of Biosciences*, 2013, 38(1): 45-51.