

# VIGS 载体在果树中的应用研究进展

张新华, 季娜娜, 闵德栋, 邵淑君, 李富军\*

(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)是植物中天然存在的一种抵御外源核酸入侵的防御反应,属于转录后基因沉默现象,现在已被开发成通过改造含有目的基因片段的病毒载体来抑制植物内源基因表达的遗传技术。与传统的植物转基因技术相比,VIGS技术具有简便、高效、高通量的优势,近年来在果树基因功能的研究中发挥了重要作用。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果树中成功构建VIGS体系的关键。本文介绍了在果树中应用的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果树基因沉默时存在的一些问题及解决方法。

**关键词:** 果树; 病毒诱导的基因沉默; 病毒载体

中图分类号: S66 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2017)04-0507-08

## Progress of research on application of VIGS vectors in fruit trees

ZHANG Xinhua, JI Nana, MIN Dedong, SHAO Shujun, LI Fujun\*

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

**Abstract:** Virus-induced gene silencing (VIGS) is a natural defense response against the intrusion of exogenous nucleic acid in plants, which recently has been exploited as a reverse genetics tool for gene function analysis in diverse plant species. The phenomenon of RNA interference (RNAi), also known as post-transcriptional gene silencing (PTGS), underlies the method of VIGS in plants. The process of VIGS starts with plant infection with the *Agrobacterium tumefaciens*, which contains the recombinant viral vector carrying a fragment of the plant gene to be silenced. When the virus vectors infect the plants, the inserted gene fragment is amplified by the viral replication system, spreads systemically in the infected plants and results in the synthesis of double-stranded RNA (dsRNA). Dicer or dicer-like enzymes cleave dsRNA into small interfering RNAs (siRNAs). The siRNA single strand is then integrated into a multicomponent RNA-induced silencing complex to trigger the degradation of the recombinant RNA and the corresponding host mRNA in a homology dependent manner. Compared with the stable transformation, the VIGS approach has a number of advantages. For example, the time involved in cloning the gene of interest and analysis of the VIGS phenotype can be done within 2-3 weeks, without going through the laborious and time-consuming process of generating stable mutants. VIGS can be applied to mature plants and thus allows the ability to assess the function for genes, whose mutation (or antisensing) might be lethal in sexually propagated plants. VIGS can be use to silence members of a gene family if they have enough homology at the nucleotide level. Since VIGS does not require a full-length gene for silencing, it becomes a vigorous method to characterize the function of an expressed sequence tag. A further advantage of VIGS is its simplicity and robustness and that it is well suited to the high-throughput analysis of many genes in a target plant genome. Consequently, this facile technology is particularly important for plants with long life cy-

收稿日期:2016-06-08 接受日期:2016-11-17

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(31201432)

作者简介:张新华,女,副教授,博士,从事果蔬采后生理和食品生物技术研究。Tel:13615336145, E-mail:zxx@sdut.edu.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel:15898761364, E-mail:lifujun@sdut.edu.cn

cles, such as fruit trees. However, VIGS technology is limited by the host range of the virus upon which the virus vector is based. Therefore, it is the key to selecting a suitable vector for successful implementation of VIGS in a variety of fruit trees. There have been three fundamental types of viruses modified to develop VIGS vectors: RNA, DNA and satellite viruses. However, there are relatively few virus vectors for the analysis of gene functions in fruit trees due to the limitations of host range and the long growth periods of fruit trees. Currently, the VIGS vectors available for silencing studies in fruit trees mainly derived from RNA viruses such as *tobacco rattle virus* (TRV), *apple latent spherical virus* (ALSV), *citrus tristeza virus* (CTV), *citrus leaf blotch virus* (CLBV) and *grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV). Among the above viruses, TRV is pathogenic for more than 400 plant species and able to spread more vigorously throughout the entire plant, including meristem tissue, yet the overall symptoms of infection are mild compared with other viruses. The vector based on TRV, which is widely used at present for VIGS analysis, can induce gene silencing in the leaf, flower, seedlings and fruit of several fruit trees, such as *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Malus domestica*, *Pyrus communis*, *Litchi chinensis*, and *Fragaria ananassa* species. Therefore, the TRV-derived VIGS holds promise as a powerful tool for large-scale analysis of the functions of genes in a variety of fruit trees. ALSV, originally isolated from an apple tree, does not induce any obvious symptoms in most of host species including apple. ALSV-mediated VIGS system can effectively induce reliable silencing of endogenous genes in the seedlings of apple, pear, and Japanese pear, which will be a powerful tool for functional genomics in Rosaceae fruit trees. CTV-based VIGS vector could be a useful tool for reverse genetics to study the functions of citrus genes involved in basic cellular functions, metabolic pathways, developmental biology, and plant-microbe interactions. The CLBV-based vector has also been proved useful to analyze gene function by reverse genetics in the long-lived citrus plants. Silencing of the endogenous *PDS* gene, which encode phytoene desaturase enzyme involved in carotenoid biosynthesis, the in grapevine plantlets has also been achieved using the GLRaV-2-derived VIGS system by inoculating seedlings, thereby providing a method and an important tool for reverse genetic studies of a variety of processes occurring in *Vitis vinifera*. Although the current virus vectors for VIGS analysis in fruit trees are limited, the number of fruit trees species amenable to VIGS experiment will be increasing with the development of newly designed virus vectors and the improvement of plant infection methods. Despite certain limitations inherent in VIGS, this technology has, to a great extent, fulfilled its promise of being a fast and efficient functional genomics tool and will undoubtedly play a significant role in the study of the gene functions of fruit trees. This review provided an update on the most recent advances of VIGS vectors and their application in the gene function analysis in fruit trees. Meanwhile, the problems and its solutions of the application of VIGS in fruit trees were also analyzed.

**Key words:** Fruit tree; Virus-induced gene silencing; Virus vector

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是一种植物抗病毒侵染的自然机制,现在已被开发成通过插入目的基因片段的重组病毒抑制植物内源基因表达的遗传技术,在植物基因功能的研究中得到越来越广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。根据已有的研究报道,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<sup>[3-5]</sup>。但是由于宿主范围以及果树生

长期长的限制,在果树基因功能的研究中可应用的病毒载体比较少,目前应用在果树中的病毒载体主要有苹果潜隐球形病毒(*Apple latent spherical virus*, ALSV)、烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)、柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘叶疱斑病毒(*Citrus leaf blotch virus*, CLBV)和葡萄卷叶伴随病毒(*Grapevine leafroll-associated virus*, GLRaV),其中以ALSV和TRV载体的应用相对较

为广泛。笔者对果树中成功诱导目的基因沉默的病毒载体及其应用实例进行了概述,并分析了存在的问题及解决方法,以期相关的研究提供一定的帮助。

## 1 ALSV载体在果树VIGS体系中的应用

ALSV属于樱桃锉叶病毒属(*Cheravirus*),最早在苹果树中发现。该病毒颗粒的直径为25 nm,有2条单链RNA(RNA1和RNA2),以及3种衣壳蛋白。ALSV包括M和B两部分,M包括2分子RNA2,B包括1个RNA1。ALSV的RNA1长度为6 813 bp,有一个单独的开放阅读框架(open read frame, 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<sup>[6-7]</sup>。

ALSV可以侵染苹果、梨等蔷薇科果树,并且不会引起严重的病毒侵染症状<sup>[8]</sup>。Sasaki等<sup>[9]</sup>从苹果中提取核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基基因(*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, rbcS*)构建ALSV-*rbc201*重组载体,随后利用微粒轰击的方法侵染苹果和梨刚发芽的子叶部分。结果发现处理后2~3周,苹果和梨植株出现了与敲除*rbcS*基因相同的表征,而用空载体侵染的植株未出现明显的改变。随后Sasaki等<sup>[9]</sup>又构建了控制苹果开花时间的关键基因(*terminal flower 1, TFL 1*)与ALSV的重组载体,侵染植株后发现,约有10%的植株在侵染后1.5~2个月就已经开花,用‘金冠’苹果的花粉为其进行授粉之后结出了籽粒繁多的小果实,而用空载体侵染的植株未有花蕾形成。该研究结果表明,ALSV介导的VIGS技术为苹果繁殖期基因功能的分析提供了可能。但与其他病毒相比,ALSV病毒载体在应用中有一定的局限性。因为ALSV病毒的基因组在翻译时先合成一个多聚前体蛋白,需经专一的蛋白酶加工裂解后才能成为成熟的蛋白质,所以构建载体时目标基因片段必须与ALSV的克隆位点相连接,限制了其高通量地表达植物基因组;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<sup>[9]</sup>。

## 2 TRV载体在果树VIGS体系中的应用

TRV是一种土壤传播病毒,属于RNA病毒属。TRV病毒的沉降系数为296~3 065和115~2 455 S,病毒粒子长为180~215和46~114 nm。病毒粒体呈直杆状,有2种粒体,长粒体(190~210)nm×25 nm,短粒体(40~80)nm×20~25 nm,长短粒体比为1:2<sup>[10]</sup>。该病毒基因组中含有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,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<sup>[11-12]</sup>。

TRV病毒寄主范围广泛,可以感染多种草本植物和作物,是目前VIGS技术中应用最为广泛的病毒载体,改造后的病毒可以促进病毒序列的插入以及后续感染,并且可以直接以宿主植物生长点的RNA为目标,具有病毒症状轻、沉默效率高、持续时间长以及可感染宿主植物的分生组织等优点<sup>[11]</sup>。

### 2.1 TRV载体在蔷薇科果树VIGS体系中的应用

2.1.1 TRV在桃果实及植株VIGS体系中的应用 TRV介导的VIGS体系已广泛应用于桃子的叶片、果实等组织中基因功能的研究。Jia等<sup>[13-14]</sup>在桃中克隆了编码镁离子螯合酶H亚基的基因(*PpCHLH*),与TRV构建了重组载体,沉默了桃叶片与果实中的*PpCHLH*基因。结果发现,*PpCHLH*基因具有多种功能。叶片中*PpCHLH*基因沉默会导致叶绿素含量的下降,影响叶片气孔的运动,使叶片变黄或变白,证明该基因与叶绿素的合成相关;另外,该基因与拟南芥中脱落酸(ABA)的受体基因同源,而且桃果实中*PpCHLH*基因的沉默会显著延迟果实的成熟进程,表明*PpCHLH*在桃果实的成熟中也发挥了重要作用。

为了研究与果实性状相关基因的功能,Bai等<sup>[15]</sup>利用TRV载体介导的VIGS技术沉默了桃果实的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*的表达是桃果肉呈现黄色的主要因素。

2.1.2 TRV在樱桃VIGS体系中的应用 为了研究

编码氧化分解 ABA 的 8-羟化酶的 4 种基因 *PacCYP707A1-4* 的功能, Li 等<sup>[16]</sup>用 TRV 介导的 VIGS 技术采用微粒轰击的方法使樱桃中的目的基因沉默。结果表明, 沉默 *PacCYP707A2* 基因明显改变了编码 ABA 及成熟相关基因的转录水平; *PacCYP707A1* 沉默刺激了果实的变色, 并且提高了果实的抗旱性。

**2.1.3 TRV 在苹果 VIGS 体系中的应用** 苹果体内乙烯的生物合成涉及多个 1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶基因 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, *ACS*), 每个 *ACS* 基因在果实的发育过程中的作用不同。Li 等<sup>[17]</sup>克隆了 *MdACS6* 基因, 并利用 TRV 载体在苹果果实水平上构建了 *MdACS6* 的 VIGS 沉默体系。研究发现, 在苹果果实发育的早期阶段, *MdACS6* 就已经开始表达, 而 *MdACS3a* 和 *MdACS1* 分别在果实收获前 35 d 和收获后开始表达。而且 *MdACS6* 编码的酶活性明显比 *MdACS3a* 和 *MdACS1* 编码的酶活性低, 所以在幼小的果实中乙烯的合成量比较少。在 VIGS 诱导的 *MdACS6* 沉默果实中没有检测到乙烯以及 *MdACS3a* 的转录, 乙烯响应因子 (ERF) 基因的表达也被抑制。而在 *MdACS6* 过表达的果实中 *MdACS3a* 和 *MdERF2* 的表达均被诱导, 进一步的研究表明 *MdERF2* 蛋白可以和 *MdACS3a* 的启动子结合, 直接对 *MdACS3a* 的表达进行调控。由此可见, TRV 载体介导的 VIGS 技术也可以成功地用于苹果果实基因功能的研究。

**2.1.4 TRV 在梨 VIGS 体系中的应用** 有些西洋梨品种果皮的颜色呈现红绿色, 研究表明花青素含量的降低可使梨果皮的绿色面积增加。UDP-葡萄糖: 类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因 (UDP-glucose: flavonoid 3-O-glycosyltransferase, *UFTG*) 是花青素合成中的关键基因, *PcMYB10* 是与 *PcUFTG* 启动子有关的转录因子基因。Wang 等<sup>[18]</sup>利用 TRV 载体沉默梨幼果中的 *PcMYB10* 基因, 结果发现经重组载体侵染的果实中, 花青素的合成受阻, *PcMYB10* 基因启动子区的甲基化程度增加, *PcMYB10* 与 *PcUFTG* 基因的表达降低, 提出 *PcMRB10* 基因启动子区的甲基化水平影响果皮红绿色的形成, *PcMYB10* 基因启动子区的高度甲基化会使梨果皮花青素含量减少, 使果皮的绿色面积增加。

## 2.2 TRV 在荔枝 VIGS 体系中的应用

荔枝果皮红色的呈现与花青素的积累也有密切的关系, Li 等<sup>[19]</sup>通过鉴定荔枝果皮中 *LcUFTG1*~

*LcUFTG4* 4 种基因后发现, *LcUFTG1* 的表达可能促进了花青素的形成。为了进一步确定 *LcUFTG1* 的功能, Li 等<sup>[19]</sup>利用 TRV 与 *LcUFTG1* 构建的重组载体, 沉默了荔枝果皮的 *LcUFTG1* 基因。结果发现果皮出现着色延迟的现象, 确定了 *LcUFTG1* 在荔枝果皮红色形成中的作用。

## 2.3 TRV 在草莓 VIGS 体系中的应用

为了确定 VIGS 技术是否可以应用于草莓中, Tian 等<sup>[20]</sup>利用 TRV 介导的 VIGS 技术, 以八氢番茄红素脱氢酶基因 (phytoene desaturase, *PDS*) 和绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, *GFP*) 为标记基因, 在草莓中构建了 VIGS 体系。试验结果表明, 沉默植株中 *PDS* 基因的转录水平明显降低, 利用荧光显微镜和紫外灯可以很方便地筛选沉默植株, 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开辟了一条新的途径。

Jia 等<sup>[21]</sup>利用该技术研究了草莓的 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, *FaNCED1*) 及 ABA 受体基因 *FaCHLH/ABAR* 的功能。结果发现, *FaNCED1* 沉默后, 草莓中的 ABA 含量显著降低且果实不着色; *FaCHLH/ABAR* 沉默的果实中也存在类似的现象, 且果实中的糖含量、与 ABA 及糖响应有关的基因表达也都下降。借助于 VIGS 技术, 该研究还进一步证实了 ABA 是促进草莓果实成熟的信号分子, 而 ABA 可能的受体 *FaCHLH/ABAR* 则作为促进因子参与这一过程。

## 3 CTV 载体在果树 VIGS 体系中的应用

CTV 属于长线形病毒属 (*Closterovirus*), 广泛分布于世界各主要柑橘产区, 能侵染绝大多数柑橘种、杂种及其近缘种植物。该病毒颗粒大小为 2 000 nm×12 nm, 含有 1 条正义单链 RNA, 由 19 296 个核苷酸组成, 是目前基因组最大的植物病毒。CTV 基因组分为 2 大区域, 含有 12 个 ORF, 至少编码 19 种蛋白质。其中, 与 CTV 复制相关的蛋白质, 如甲基转移酶、螺旋酶和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶由靠近 5' 端的 ORF 1a 和 ORF 1b 编码。CTV 3' 端含有剩下的 10 个 ORF, 包括与内含体的形成有关的基因及负责调控 CTV 复制过程中正链和负链 RNA 比例的 RNA 结合蛋白相关的基因等<sup>[22]</sup>。一般的植物病毒只

编码一种沉默抑制子,而且大多不能侵染果树,稳定性较差,容易丢失插入的外源基因,而CTV编码3种RNA沉默抑制子,可以在柑橘树中稳定地表达外源基因10 a以上<sup>[23]</sup>。

目前,在柑橘植株中利用CTV已成功构建了VIGS体系。研究发现,亚洲柑橘木虱若虫翼瓣异常基因(*abnormal wing disc, Awd*)表达降低会导致成虫翼畸形。这不但会使成虫的死亡率上升,而且会损害木虱的飞行能力,降低柑橘黄龙病菌的传播。根据这一信息,Hajeri等<sup>[24]</sup>用CTV介导的VIGS技术构建了CTV-*Awd*重组载体,并通过农杆菌侵染柑橘,沉默*Awd*基因。随后用沉默后的柑橘植株饲喂100只亚洲柑橘木虱成虫,结果发现其中约有45%的若虫发展成为不同程度翼畸形的成虫。转基因技术在柑橘上应用比较困难,该研究表明,CTV介导的VIGS技术是一种快速筛查柑橘病虫害控制相关基因的有力工具,并为柑橘黄龙病的防治提供了解决方案。

## 4 CLB V载体在果树VIGS体系中的应用

CLBV属乙型线形病毒科(Betaflexiviridae)柑橘叶斑病毒属(*Citriovirus*),有一个长度为8 747 bp的正义单链RNA,具有3个ORF,在3'和5'端有非编码区<sup>[25-26]</sup>。该病毒主要通过嫁接传播,可侵染大多数柑橘品种。而且与CTV病毒载体相比,CLBV的侵染不会引起明显的病毒感染症状,因此基因沉默的表型不会被病毒的表型所掩盖。另外,CLBV不是木质部难养病毒,因此该载体可以用于非韧皮部组织包括分生组织的基因表达和沉默<sup>[27]</sup>。

在VIGS的研究中,Agüero等<sup>[28]</sup>利用不同长度的柑橘*PDS*基因片段与CLBV构建重组载体,侵染柑橘植株后发现,经重组载体侵染的植株均出现了光漂白现象,但是沉默程度与插入的基因片段大小有关。另外,由*PDS*基因沉默引起的光漂白现象一般出现在叶柄及邻近的区域,但是不规则的白色斑块在叶片、叶柄、刺尖以及茎上的出现是随机的,这种沉默表型不均匀分布的现象对于无明显沉默表型基因功能的研究不利。

## 5 GLRaV载体在果树VIGS体系中的应用

葡萄卷叶伴随病毒(*Grapevine leaf roll-associated*

*virus, GLRaV*)是世界上分布最广、对葡萄种植业影响最大的葡萄病毒之一,可引起葡萄的卷叶症状,影响果穗着色,推迟果实成熟,降低果实的含糖量<sup>[27-29]</sup>。目前已报道的11种不同血清型的葡萄卷叶伴随病毒,分别为GLRaV-1~GLRaV-9、GLRaV-Pr和GLRaV-De。在分类学上,GLRaV-2为长线病毒科(Closteroviridae)长线型病毒属(*Closterovirus*)成员,主要通过无性繁殖传播<sup>[30]</sup>。GLRaV-2含有一条约16.5 kb的正义单链RNA,包括9个ORF,分别编码类木瓜蛋白酶、甲基转移酶、螺旋酶、复制酶、热激蛋白、外壳蛋白和其他几种未知功能的蛋白,在5'端和3'端分别为76 nt和210 nt的非编码区<sup>[31]</sup>。

GLRaV-2是在葡萄植株中实施VIGS技术的载体,其可以随着植株体内糖分的运输而到达植株的各个部位。Kurth等<sup>[30]</sup>利用葡萄的*PDS*基因和镁离子螯合酶I亚基基因(subunit I of magnesium-protoporphyrin IX chelatase, *ChII*)与GLRaV-2构建重组载体在葡萄植株中成功构建了VIGS体系,并成功鉴定了葡萄植株中的抗性和易感基因,阐明了糖分在叶片到根系和果实中的运输过程。GLRaV-2载体的开发为葡萄基因功能的研究提供了重要的技术支持。

## 6 病毒载体诱导果树基因沉默的局限性及应用前景

### 6.1 病毒载体诱导果树基因沉默的局限性

虽然现在已有多个病毒载体可以在果树的植株、叶片或果实等组织中实施VIGS技术,但目前VIGS在果树中应用还存在一些问题。

6.1.1 病毒载体的扩散能力 目的基因的沉默效率及均一性与病毒在果树体内的扩散能力密切相关,针对某一具体的果树而言,除选择最适宜的病毒载体之外,控制环境条件也是在果树体内成功实施VIGS的关键。对于病毒的扩散和有效的沉默,温度是最主要的环境因子,温度的变化直接影响目的基因在果树体内的沉默效果。因此,可控温控湿的培养室是进行VIGS试验较为理想的选择,而在温度波动较大的环境中不适宜做VIGS试验<sup>[32-34]</sup>。

6.1.2 病毒载体的安全性 病毒是果树的重要病原物,且大多数植物病毒都可以昆虫为介体进行传播。所以,在构建VIGS病毒载体时尽量选用当地已经存在的、无虫传能力的弱毒株,或对病毒载体进行

修饰使其不引起严重症状或被介体传播<sup>[35-36]</sup>。这样不但可以避免因使用病毒载体而引起的果树病毒病的危害和流行,也有利于基因沉默表型的观测。

**6.1.3 载体宿主的局限性** 现阶段尽管已经有多种病毒载体被成功地应用到 VIGS 体系中来,但是还有很多果树仍然没有合适的病毒载体。目前最稳定和最有效的 VIGS 载体都有一定的宿主范围限制,有的虽然已构建了 VIGS 体系,但是其沉默效果并不理想。比如 ALSV 载体虽然可以侵染甜樱桃和某些品种的杏及桃等果树,但是在不同的果树树种及栽培品种中病毒的扩散和繁殖能力有很大差距<sup>[37]</sup>。

**6.1.4 沉默持续的时间问题** 由于 VIGS 利用重组病毒对植物基因进行暂时沉默,因此一般有效的沉默期为 1 个月左右,此后将出现沉默的衰减和表型的恢复,这对于生长周期较长的果树植物显然不够<sup>[38-39]</sup>。有研究表明,虽然采用低温和低湿的方法可适当延长基因沉默的时间<sup>[32]</sup>,但却不利于果树本身的生长,并会延长果树的生长周期。通过病毒载体的选择或改造来增强载体的活性,从而延长目的基因沉默时间和增强沉默的效果,可能是今后需要努力的方向。

另外,病毒载体如何有效地接种至果树体内,也是 VIGS 技术实施中的关键性步骤<sup>[40-41]</sup>。

## 6.2 病毒载体诱导果树基因沉默的应用前景

虽然 VIGS 技术目前还存着一些问题,但与转基因、基因敲除、反义抑制等基因功能研究方法相比,VIGS 作为一种反向遗传学新技术具有许多明显的优势。首先,VIGS 技术操作简单,研究周期短。VIGS 一般通过机械伤口侵染或农杆菌的侵染等简单的侵染使目的基因沉默,不需要进行繁杂的突变体筛选及转基因植株的传代鉴定工作,一般 2~3 周就可使目的基因沉默,完成一个试验周期,因此大大简化了操作的过程。而利用传统的转基因技术,一般需要数年的时间。其次,VIGS 技术非常有利于果树及果实发育相关基因功能的鉴定。与一般的植物相比,果树的童期长,对果树发育非常关键的基因功能缺失以后,会影响植株的正常生长,难以结出果实,甚至导致植株死亡,所以传统的转基因技术在果树基因功能的研究中具有一定的局限性。而 VIGS 技术不需要转基因,而且可以在幼苗、花、茎以及果实等多种器官中进行<sup>[13-14]</sup>,这在果树发育相关基因及与果实性状相关基因的研究上具有很大的优势。

第三,便于研究多基因家族的基因功能。利用基因家族保守序列的区段构建重组 VIGS 载体,可使整个基因家族的基因同时沉默,有利于研究家族基因的功能;也可以通过对病毒载体的设计和构建,特异性地沉默基因家族中单个或多个基因,解决基因家族的冗余性问题,而利用传统的转基因技术则很难实现<sup>[11]</sup>。另外,VIGS 还具有将 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等<sup>[42]</sup>。

因此,随着新的载体不断研发,VIGS 作为一个高效的研究基因功能的技术在果树上的应用必将逐步完善,会在更多的果树物种中得到应用,并将成为果树功能基因组学研究中广泛应用的技术。

## 参考文献 References:

- [1] 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[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(5): 734-746.
- [2] LEE W S, RUDD J J, KANYUKA K. Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zygomoseptoria tritici* susceptibility and resistance[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 79: 84-88.
- [3] PURKAYASTHA A, MATHUR S, VERMA V, SHARMA S, DAS-GUPTA I. Virus-induced gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus[J]. *Planta*, 2010, 232(6): 1531-1540.
- [4] LIU B, PREISSER E L, CHU D, PAN H P, XIE W, WANG S L, WU Q J, ZHOU X G, ZHANG Y J. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *tomato yellow leaf curl virus*[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(9): 4929-4937.
- [5] 张新华,李富军. 病毒诱导的基因沉默技术及其在植物中的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(2): 419-424.  
ZHANG Xinhua, LI Fujun. Research advances of virus-induced gene silencing technology in plant [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2012, 32(2): 419-424.
- [6] IGARASHI A, YAMAGATA K, SUGAI T, TAKAHASHI Y, SUGAWARA E, TAMURA A, YAEGASHI 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[J]. *Virology*, 2009, 386(2): 407-416.
- [7] LI C, YOSHIKAWA N, TAKAHASHI T, ITO T, YOSHIDA K, KOGANEZAWA H. Nucleotide sequence and genome organization of *Apple latent spherical virus*: a new virus classified into the family Comoviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(2): 541-547.

- [8] CHANTREAU M, CHABBERT B, BILLIARD S, HAWKINS S, NEUTELINGS G. Functional analyses of cellulose synthase genes in flax (*Linum usitatissimum*) by virus-induced gene silencing [J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(9): 1312-1324.
- [9] SASAKI S, YAMAGISHI N, YOSHIKAWA N. Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using *Apple latent spherical virus* vectors[J]. Plant Methods, 2011, 7(1): 15.
- [10] DONAIRE L, BARAJAS D, MARTÍNEZ- GARCÍA B, MARTÍNEZ-PRIEGO L, PAGÁN I, LIAVE C. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs[J]. Journal of Virology, 2008, 82(11): 5167-5177.
- [11] RATCLIFF F, MARTÍN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. The Plant Journal, 2001, 25(2): 237-245.
- [12] SENTHIL- KUMAR M, MYSORE K S. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*[J]. Nature Protocols, 2014, 9(7): 1549-1562.
- [13] JIA H F, GUO J X, QIN L, SHEN Y Y. Virus-induced *PpCHLH* gene silencing in peach leaves (*Prunus persica*) [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2010, 85(6): 528-532.
- [14] JIA H F, CHAI Y M, LI C L, QIN L, SHEN Y Y. Cloning and characterization of the H subunit of a magnesium chelatase gene (*PpCHLH*) in peach[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2011, 30(4): 445-455.
- [15] BAI S, TUAN P A, TATSUKI M, YAEGAKI H, OHMIYA A, YAMAMIZO C, MORIGUCHI T. 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[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(1): 257-264.
- [16] LI Q, CHEN P, DAI S J, SUN Y F, YUAN B, KAI W B, PEI Y L, HE S H, LIANG B, ZHANG Y S, LENG P. *PacCYP707A2* negatively regulates cherry fruit ripening while *PacCYP707A1* mediates drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(13): 3765-3774.
- [17] LI T, TAN D M, LIU Z, JIANG Z Y, WEI Y, ZHANG L C, LI X Y, YUAN H, WANG A D. Apple *MdACS6* regulates ethylene biosynthesis during fruit development involving ethylene-responsive factor[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(10): 1909-1917.
- [18] WANG Z J, MENG D, WANG A D, LI T L, JIANG S L, CONG P H, LI T Z. The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in max red bartlett pear[J]. Plant Physiology, 2013, 162(2): 885-896.
- [19] LI X J, ZHANG J Q, WU Z C, LAI B, HUANG X M, QIN Y H, WANG H C, HU G B. Functional characterization of a glucosyltransferase gene, *LcUFGT1*, involved in the formation of cyanidin glucoside in the pericarp of *Litchi chinensis*[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 156(2): 139-149.
- [20] TIAN J, CHENG L, HANZH Y. Tobacco rattle virus mediated gene silencing in strawberry plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 120(3): 1131-1138.
- [21] JIA H F, LU D, SUN J H, LI CL, XING Y, QIN L, SHEN Y Y. Type 2C protein phosphatase *ABII* is a negative regulator of strawberry fruit ripening[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6): 1677-1687.
- [22] KARASEV A V, BOYKO V P, GOWDA S, NIKOLAEVA O V, HILF M E, KOONIN E V, NIBLETT C L, CLINE K, GUMPF D J, LEE R F, GARNSEY S M, LEWANDOWSKI D J, DAWSON W O. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome[J]. Virology, 1995, 208(2): 511-520.
- [23] DAWSON W O, FOLIMONOVA S Y. Virus-based transient expression vectors for woody crops: a new frontier for vector design and use[J]. Annual Review of Phytopathology, 2013, 51: 321-337.
- [24] HAJERI S, KILLINY N, EI-MOHTAR C, DAWSON W O, GOWDA S. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing) [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 176: 42-49.
- [25] VIVES M C, MARTÍN S, AMBRÓS S, RENOVELL Á, NAVARRO L, PINA J A, MORENO P, GUERRI J. Development of a full-genome cDNA clone of *Citrus leaf blotch virus* and infection of citrus plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(6): 787-797.
- [26] RENOVELL Á, VIVES M C, RUIZ- RUIZ S, NAVARRO L, MORENO P, GUERRI J. The *citrus leaf blotch virus* movement protein acts as silencing suppressor[J]. Virus Genes, 2012, 44(1): 131-140.
- [27] OSMAN F, LEUTENEGGER C, GOLINO D, LI M J, CHENG Y Q. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses 1-5* and 9[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 141(1): 22-29.
- [28] AGÜERO J, VIVES M C, VELÁZQUEZ K, PINA J A, NAVARRO L, MORENO P, GUERRI J. Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants[J]. Virology, 2014, 460: 154-164.
- [29] 裴光前,董雅凤,张尊平,范旭东,李丽丽. 4种葡萄卷叶伴随病毒多重 RT-PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 21-26.
- PEI Guangqian, DONG Yafeng, ZHANG Zunping, FAN Xudong, LI Lili. Detection of four grapevine leafroll-associated viruses by multiplex RT-PCR[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 21-26.
- [30] KURTH E G, PEREMYSLOV V V, PROKHNEVSKY A I, KASS-CHAU K D, MILLER M, CARRINGTON J C, DOLJA V V. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for

- grapevine[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(11): 6002–6009.
- [31] MENG B, LI C, GOSZCZYNSKI D E, GONSALVES D. Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis[J]. *Virus Genes*, 2005, 31(1): 31–41.
- [32] FU D Q, ZHU B Z, ZHU H L, ZHANG H X, XIE Y H, JIANG W B. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity[J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(1): 153–160.
- [33] 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[J]. *园艺学报*, 2015, 42(8): 1495–1504.
- ZHAO Zhen, LIU Fuzhong, ZHANG Ying, QI Dongxia, CHEN Yuhui, LIAN Yong. VIGS expression vector construction and expression analyses of *SmMsrA* gene in eggplant[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(8): 1495–1504.
- [34] CHELLAPPAN P, VANITHARANI R, OGBE F, FAUQUET C M. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 1828–1841.
- [35] LANGE M, YELLINA A L, ORASHAKOVA S, BECKER A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 975(5): 1–14.
- [36] HEFFERON K. Plant virus expression vector development: new perspectives[J]. *Biomed Research International*, 2014, 2014: 1–6.
- [37] KAWAI T, GONOI A, NITTA M, YAMAGISHI N, YOSHIKAWA N, TAO R. Virus-induced gene silencing in various *Prunus* species with the *Apple latent spherical virus* vector[J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 199: 103–113.
- [38] LIU Y, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. *Plant Journal*, 2002, 31(6): 777–786.
- [39] LU R, MARTIN-HERNANDEZ A M, PEART J R, MALCUIT I, BAULCOMBE D C. Virus-induced gene silencing in plants[J]. *Methods*, 2003, 30(4): 296–303.
- [40] MANHÃES A M E A, DE OLIVEIRA M V V, SHAN L. Establishment of an efficient virus-induced gene silencing (VIGS) assay in *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated rubbing infection[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1287(2): 235–241.
- [41] YAN H, FU D, ZHU B, LIU H P, SHEN X Y, LUO Y B. 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.
- [42] 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[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(1): 193–210.