

TRV介导欧洲甜樱桃果实VIGS体系的建立

齐希梁,李明*,刘聪利,宋露露

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

摘要:【目的】建立欧洲甜樱桃果实VIGS体系。【方法】利用In-Fusion cloning技术,构建欧洲甜樱桃的烟草脆裂病毒(TRV)介导基因沉默表达载体pTRV2-ANS,转入农杆菌GV3101中,采用注射压迫法侵染欧洲甜樱桃果实,通过分子检测、qRT-PCR和表型观察技术评价TRV介导VIGS沉默体系的效果。【结果】TRV::ANS侵染的欧洲甜樱桃果实 ans 基因的表达显著低于TRV::00侵染的果实。与TRV::00比较,TRV::ANS侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮和果肉颜色都没有发生着色,果皮和果肉颜色呈绿色,而TRV::00侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮和果肉正常着色。【结论】研究建立的TRV介导欧洲甜樱桃VIGS体系可有效沉默欧洲甜樱桃果实内源基因表达。该体系为欧洲甜樱桃果实品质基因的功能验证及分子机制研究奠定了技术基础。

关键词: 欧洲甜樱桃;TRV;VIGS;基因沉默;果实

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)11-1309-07

Construction of TRV-mediated virus induced gene silencing (VIGS) system in sweet cherry fruit

QI Xiliang, LI Ming*, LIU Congli, SONG Lulu

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an important horticultural crop cultivated in temperate areas for notable economic value. However, to date, our understanding of the molecular mechanisms dealing with the regulation of fruit quality in sweet cherry and other horticultural fruit trees is still quite limited, and few genes related to the molecular mechanisms have been identified for the limitation of the tools for gene function analysis. The genomics sequences of sweet cherry have been published. Therefore, the establishment of transient genetic transformation system of sweet cherry fruit is urgently needed for identification and characterization of genes associated with fruit quality to illuminate the corresponding molecular mechanisms. Virus induced gene silencing (VIGS) is one of RNA-mediated post transcriptional gene silencing (PTGS) in that RNAs are specifically degraded if there is a similar sequence between viruses and plant genes. In recent years, VIGS has been developed as an effective genetics tool used for functional gene characterization in a range of dicot plant species, including *Nicotiana benthamiana* (tobacco), *Solanum lycopersicum* (tomato), *Gossypium* spp. (cotton), *Triticum aestivum* (wheat), *Hordeum vulgare* (barley), *Zea mays* (maize), *Oryza sativa* (rice), *Malus pumila* (apple), *Citrus reticulata* (citrus), and *Vitis vinifera* (grape). In this study, a highly efficient TRV-based VIGS system in sweet cherry fruit was established, and the VIGS technique could be applied in sweet cherry fruit, and would be a powerful new tool for corresponding studies of fruit quality. 【Methods】In-Fusion cloning technology was performed to generate the pTRV2-ANS plasmid for constructing TRV-VIGS vector. A 370-bp fragment of *PaANS* was amplified with the primers PaANS-F and PaANS-R, including 17-bp-long overhangs identical to the corresponding pTRV2 sequence digested with *EcoR* I or

收稿日期: 2018-05-28

接受日期: 2018-07-27

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2018-ZFRI); 中央级科研院所基本科研业务费专项(1610192018201)

作者简介: 齐希梁,男,助理研究员,博士,主要从事樱桃分子生物学研究。Tel: 0371-65330965, E-mail: qiliangxi@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330965, E-mail: liming06@caas.cn

Kpn I, by PCR and inserted into the pTRV2 vector digested with *Eco*R I and *Kpn* I by In-Fusion cloning to generate the pTRV2-ANS plasmid. Then plasmid pTRV2-ANS was transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain via electroporation. TRV-mediated gene silencing was performed with *A. tumefaciens*-mediated transformation. *A. tumefaciens* strain GV3101 was resuspended in the *Agrobacterium* infiltration buffer (10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·L⁻¹ MES, pH 5.6, 400 μmol·L⁻¹ acetosyringone) to a final OD₆₀₀ of 0.8-1.0. Mixed *Agrobacterium* GV3101 strains containing the *pTRV1*, *pTRV2* or *pTRV2-ANS* vectors were infiltrated using a needle-less syringe into the basal pedicel of sweet cherry fruit 14 days after full bloom (DAFB) until the whole fruit was permeated. The inoculated fruits were treated with bagging for 3 days. Morphological analysis of sweet cherry fruit, including flesh color and peel color, molecular detection and qRT-PCR technology were used to evaluate TRV mediated VIGS silencing efficiency. 【Results】Quantification of the TRV virus biomass in fruit tissue of sweet cherry were performed using RT-PCR on 7 days post inoculation (dpi) with specific primers pTRV1-F/pTRV1-R and pTRV2-F/pTRV2-R for testing whether the TRV-vector could directly infect sweet cherry fruit. The results showed that only a 647 bp fragment was amplified using the primer pair pTRV1-F/pTRV1-R in the cDNA of TRV::ANS-infected fruits and the TRV::00-infected fruits. Meanwhile, the TRV-RNA2-specific PCR product was detected only in the TRV-infiltrated sweet cherry fruit, suggesting that TRV virus could directly infect sweet cherry fruit. In order to assess the effectiveness of TRV-VIGS in sweet cherry fruit, the expression of endogenous PaANS in the landrace sweet cherry cultivar 'Brooks' was detected by a semi-quantitative RT-PCR assay using cDNA samples from infiltrated fruit at 10 dpi. The expression of PaANS was markedly reduced in the TRV::ANS-infected fruit compared with the TRV::00-infected fruit. The fruit skin of TRV::00-infected fruits sector developed a yellow bottom with flush color phenotype at 14 dpi. Meanwhile, the fruit skin of TRV::ANS-infected fruits sector did not turn yellow like the wild type fruit. At 28 dpi, compared with TRV::00-infected sweet cherry fruit, the skin of the TRV::ANS-infected sweet cherry fruit sector still remained green or light yellow green. In contrast, the skin of TRV::00-infected sweet cherry fruit sector turned red. Furthermore, the pulp of TRV::00-infected sweet cherry fruit sector developed yellow or pink color, while the pulp of the TRV::ANS-infected sweet cherry fruit sector was still green or white. 【Conclusion】The ans gene was effectively silenced in TRV::ANS-infected sweet cherry fruit, and the fruit peel and pulp of TRV::ANS-infected sweet cherry fruit showed significant defects compared with TRV::00-infected sweet cherry fruit, indicating that TRV mediated VIGS system was successfully established in sweet cherry fruit. These findings revealed the great potential of application of VIGS for studying fruit development and ripening, and could be an alternative to transgenic technology. This system in sweet cherry fruit would likely prove a valuable tool in future research on functional identification of genes contributing to fruit quality formation and controlling the metabolic networks of fruit development in sweet cherry.

Key words: Sweet cherry; Tobacco rattle virus (TRV); Virus-induced gene silencing (VIGS); Gene silencing; Fruit

欧洲甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 是一种重要的经济果树, 为蔷薇科李属植物^[1]。鉴于欧洲甜樱桃的再生和遗传转化体系非常困难, 进行基因的功能注释研究一直是一个技术瓶颈, 而且欧洲甜樱桃从实生苗到结果需要3~5 a(年)时间, 果实相关基因的表

型鉴定困难更大^[2-4]。然而果实的瞬时遗传转化可实现目标基因在植物体内沉默, 也可对基因进行功能注释^[5]。因此建立欧洲甜樱桃果实瞬时遗传转化体系是亟待解决的关键问题。

病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene si-

lencing, VIGS)技术是转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)-RNA的一种表现,是利用携带一段靶基因序列的cDNA片段的病毒载体侵染植株,引起植物内源基因沉默与表型变异,进而通过表型变异进行基因功能研究的方法^[6]。具有周期短、不需要遗传转化、操作简单等优势,成为植物基因功能研究领域最具吸引力的技术手段之一,近年来已被广泛应用于水稻、番茄、苹果、小麦^[7]、玉米^[8]、棉花^[9]、柑橘^[10]、葡萄^[11]等作物的基因功能研究,然而目前VIGS应用于欧洲甜樱桃果实生长发育相关基因的功能研究少有报道。

影响植物颜色的基因常常被用作报告基因评价VIGS系统沉默效果。果实着色主要参与了花色素和类胡萝卜素代谢^[12-13],而欧洲甜樱桃果皮颜色(红、黄等颜色)主要取决于花色素的含量^[4]。花青素主要以糖苷形式存在于表皮细胞的液泡中,属于黄酮类化合物。无色花青素双加氧酶/花青素合成酶(LDOX/ANS)是类黄酮化合物合成途径中的关键限速酶之一,催化无色花色素到有色花色素的转变^[15]。因此笔者利用病毒诱导的基因沉默技术,构建带有 ans 基因序列的烟草脆裂病毒TRV载体,对欧洲甜樱桃果实中 $PaANS$ 基因进行沉默,并对基因沉默的欧洲甜樱桃果实进行半定量RT-PCR检测和表型观察,旨在建立TRV介导的欧洲甜樱桃果实VIGS体系,为欧洲甜樱桃果实品质基因功能验证及分子机制研究奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料。欧洲甜樱桃栽培品种‘布鲁克斯’来自中国农科院郑州果树研究所樱桃种质资源圃,砧木为‘ZY-1’,树龄5~6 a, 树体生长正常。

菌株和TRV病毒载体。VIGS载体为烟草脆裂病毒载体(tobacco rattle virus, TRV) pTRV1与pTRV2由清华大学刘玉乐教授惠赠,根癌农杆菌菌种GV3101由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 欧洲甜樱桃叶片总RNA的提取参照试剂盒EASYspin RNA Plant RNA rapid extraction kit(北京原平皓生物科技有限公司,天津,中国)说明书进行。pTRV2-ANS载体构建采用In-Fusion Cloning技术进行。将pTRV2进行EcoR I和Kpn I

双酶切,回收大片段作为连接载体。利用分别带有17个重叠区域(与经EcoR I和Kpn I线性化的pTRV2片段互为反向互补的接头)的 ans 基因特异性引物(上游引物PaANS-F 5'-AGTAAGGTTACC-GAATTCGCCTCAAGTCCCACCATTGA-3',下游引物PaANS-R 5'-GAGCTCGGTACCGGATCCCTCAATGTAATCAGCAGGTG-3')从欧洲甜樱桃cDNA中扩增出370 bp的 ans 片段,回收此片段作为插入片段。利用In-Fusion™ HD Cloning kit(Clontech, Mount-ain View, CA, United States)将 ans 片段连接到线性化的pTRV2构建pTRV2-ANS载体,并转入大肠杆菌DH5 α 感受态中,挑取阳性菌株,经PCR鉴定,双酶切鉴定和测序正确后,将pTRV2-ANS载体转入农杆菌菌种GV3101中备用。

1.2.2 欧洲甜樱桃VIGS系统的建立 取pTRV1、pTRV2、pTRV2-ANS的农杆菌GV3101各1 mL接种到10 mL的LB液体培养基(含100 mg·L⁻¹卡那霉素、100 mg·L⁻¹庆大霉素、50 mg·L⁻¹利福平)中,28℃,200 r·min⁻¹,过夜活化培养24 h。取2 mL的菌液转接到100 mL的LB液体培养基(含100 mg·L⁻¹卡那霉素、100 mg·L⁻¹庆大霉素、50 mg·L⁻¹利福平,10 mmol·L⁻¹ MES和100 μ mol·L⁻¹ As)中,28℃,180 r·min⁻¹培养8 h左右。当OD₆₀₀的菌液浓度为0.7~0.8时,取80 mL菌液4℃、6 000 r·min⁻¹离心3 min,收集菌液,将菌体重悬于注射基质(10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、10 mmol·L⁻¹ MES和400 μ mol·L⁻¹ As, pH=5.6)中,重悬菌液的OD₆₀₀为0.8~1.0。分别将pTRV2、pTRV2-ANS与pTRV1菌液1:1混合,室温静置3~5 h后侵染。选取花后14 d花生粒大的欧洲甜樱桃果实,用10 mL注射器采用注射压迫法注射欧洲甜樱桃果实的果柄处,看到果实组织中果实表面颜色改变表示注射液扩散到果实组织,注射后的欧洲甜樱桃果实发育阶段的温度和湿度要相对低,温度不宜超过25℃,湿度控制在30%~70%,同时注射过的果实进行套袋处理3 d后,去除果袋。

1.2.3 TRV病毒的分子检测与半定量RT-PCR检测 为了验证烟草脆裂病毒是否插入欧洲甜樱桃果实基因组并表达,依据pTRV1和pTRV2序列信息设计特异性引物对pTRV1-F/pTRV1-R(上游引物5'-TTACAGGTTATTTGGGCTAG-3',下游引物5'-CCGGGTTCAATTCCTTATC-3'),pTRV2-F/pTRV2-R(上游引物pTRV2-F 5'-TTTATGTTTCAGGCG-

GTTCTTGTG-3', 下游引物 pTRV2-R 5'-CAAAC-GCCGATCTCAAACAGTC-3'), 其中 pTRV1 载体的引物对设计在 RNA 依赖 RNA 聚合酶元件上 (PCR 产物大小理论上为 647 bp), pTRV2 载体的引物设计在多克隆位点之间 (PCR 产物大小理论上为 372 bp)。

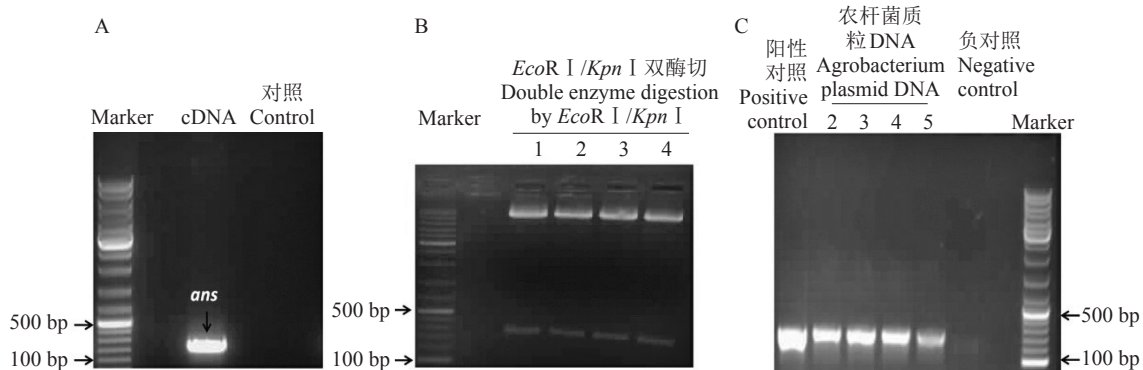
分别提取空载 TRV::00 和 TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实样品的总 RNA, 并利用 FastQuant RT (With gDNase) kit [天根生化科技(北京)有限公司, 北京, 中国] 反转录成 cDNA, 以欧洲甜樱桃的 *Histone2* (Pav_sc0000671.1, His2-F 5'-GGTGTGCTTCC-GCAGATAA-3', His2-R 5'-TCCTCCTTGGGTGGT-GAAT-3') 基因为内参, 对不同样品的 cDNA 含量进行调节, 然后利用 *PaANS* 基因特异性引物 PaANS-J-F 5'-GTATGCCAATGACCAGGCCTCT-3', PaANS-J-R 5'-CTTCTCCTTTGGTGGCTCACA-3' 检测沉

默后 *ans* 基因的表达水平。

2 结果与分析

2.1 pTRV2-ANS 载体的构建

以欧洲甜樱桃叶片的 cDNA 为模板, 利用特异性引物对 PaANS-F/PaANS-R 扩增出大约 400 bp 的 *ans* 片段 (图 1-A), 将扩增的 *ANS* 片段回收后与经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 线性化的 pTRV2 载体发生连接反应成功构建 pTRV2-ANS 载体, 并经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切验证 (图 1-B)。将含有 pTRV2-ANS 载体的质粒转入农杆菌 GV3101 中, 分别利用特异性引物对 PaANS-F/PaANS-R 进行 PCR 鉴定, 都能扩增出与阳性对照相同的目标片段 (图 1-C), 表明 pTRV2-ANS 载体成功转入农杆菌 GV3101 中, 可以用于侵染欧洲甜樱桃果实。



A. *ans* 基因的 PCR 扩增; B. pTRV2-ANS 质粒酶切鉴定; C. 农杆菌中含有 *ans* 基因质粒 DNA 的 PCR 扩增。

A. PCR detects sweet cherry *ans* gene; B. Identification of plasmids by restriction enzyme; C. PCR products of agrobacterium plasmids DNA.

图 1 pTRV2-ANS 载体构建

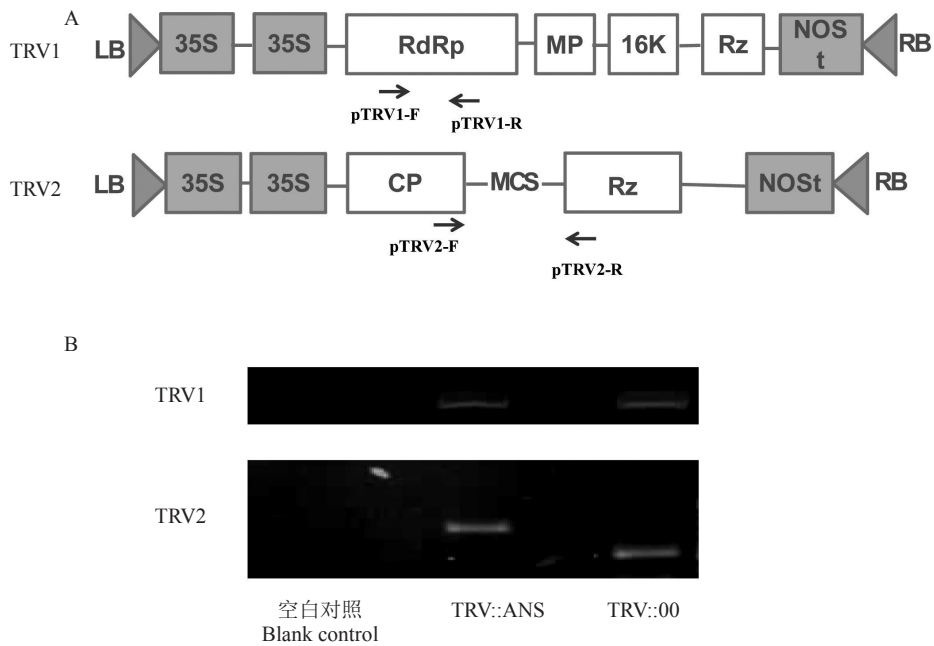
Fig. 1 pTRV2-ANS vector construction

2.2 VIGS 沉默欧洲甜樱桃果实体系的建立

2.2.1 TRV 病毒的分子检测 为验证 TRV 病毒能否成功插入欧洲甜樱桃果实基因组并表达, 分别以接种 7 d 后的空白对照 (未做任何处理)、空载 TRV::00 和 TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实样品的总 RNA 并反转录成 cDNA 为模板, 分别采用特异性引物对 pTRV1-F/pTRV1-R 和 pTRV2-F/pTRV2-R 进行 PCR 检测 (图 2-A)。结果表明, 接种空载 TRV::00 侵染的欧洲甜樱桃果实样品中分别能扩增出 647 bp 和 372 bp 的目的条带, 接种 TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实样品中能扩增出 647 bp 和 724 bp 的目的条带, 空白对照没有扩增出目的条带 (图 2-B), 表明 TRV::

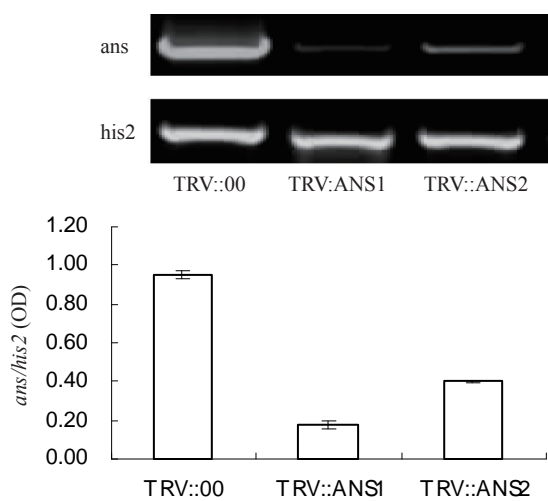
00 和 TRV::ANS 病毒载体成功在欧洲甜樱桃果实中复制、转移和表达。

2.2.2 半定量 RT-PCR 检测 *PaANS* 基因的表达量 为了确定欧洲甜樱桃果实中 *PaANS* 基因的沉默程度, 分别提取侵染 10 d 的 TRV::00 和 TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实样品总 RNA, 以欧洲甜樱桃的 *Histone2* 为内参基因进行半定量 RT-PCR 分析。结果显示, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实 *ans* 基因的表达显著低于 TRV::00 侵染的果实 (图 3)。利用软件 Quantity One 定性分析表明, 与 TRV::00 比较, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实中的 *ans* 表达量下降了 58.9%~81.0% (图 3), 表明 TRV::ANS 侵染的



A. pTRV1 与 pTRV2 载体及引物设计示意图; B. PCR 检测 pTRV1 与 pTRV2 载体在樱桃果实中的表达情况。
A. Plasmid pTRV1 and pTRV2 and primer schematic diagram; B. The PCR detection of RNA1 and RNA2 of TRV in sweet cherry fruit.

图 2 TRV 病毒的分子检测
Fig. 2 PCR detection of TRV virus



TRV::ANS1 和 TRV::ANS2 是 2 个独立的重复个体。下同。
Two independent events, TRV::ANS1 and TRV::ANS2. The same below.

图 3 欧洲甜樱桃果实 *ans* 基因的相对表达量
Fig. 3 relative expression of *ans* gene in sweet cherry fruit using semi-quantitative RT-PCR

果实中 *ans* 基因被有效地沉默。

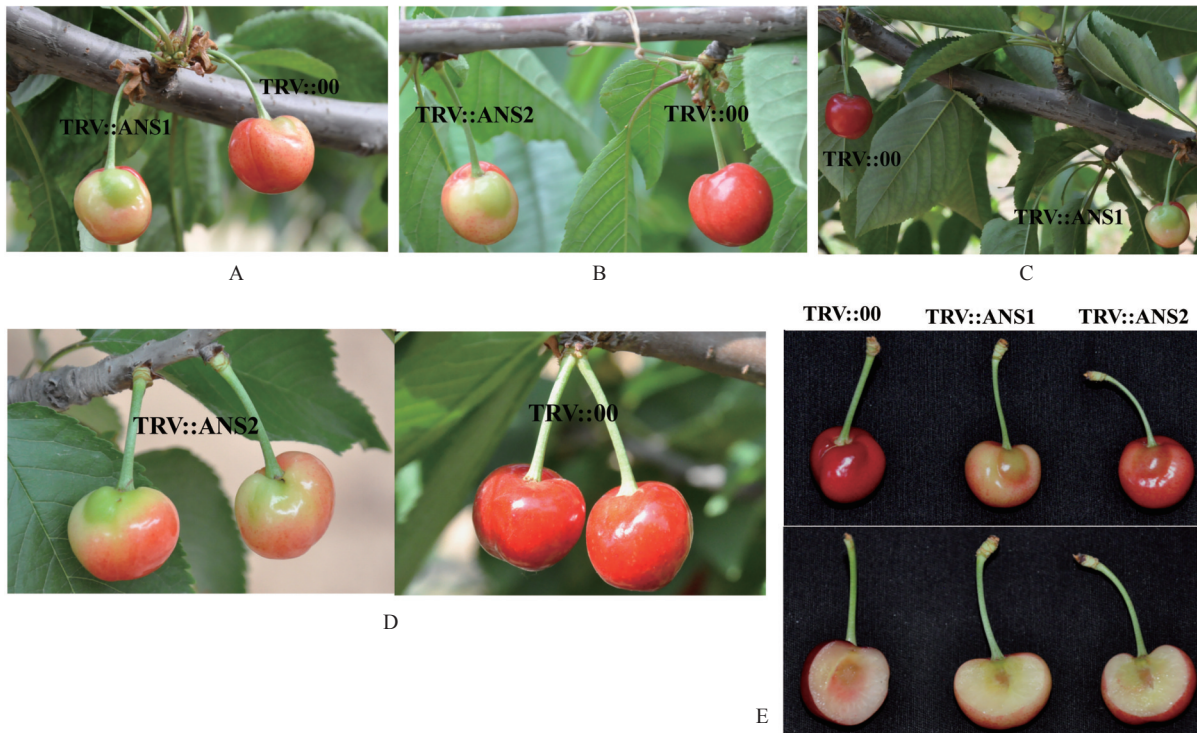
2.2.3 表型性状观察 农杆菌 GV3101 侵染 14 d 后, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮颜色仍然是绿色, 没有发生果皮颜色的着色, 而 TRV::00 侵

染的欧洲甜樱桃果实的果皮开始着色, 果皮颜色呈现出黄底红晕(图 4-A~B)。农杆菌侵染 21 d 后, 与 TRV::00 侵染的欧洲甜樱桃果实相比较, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮颜色仍然是绿色或浅黄色, TRV::00 侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮颜色呈红色(图 4-C~D)。农杆菌侵染 28 d 后, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮颜色为黄绿色, TRV::00 侵染的欧洲甜樱桃果实的果皮颜色呈深红色(图 4-E)。TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实的果肉颜色为绿色或白色, 而 TRV::00 侵染的欧洲甜樱桃果实的果肉颜色呈粉红色(图 4-E)。表明 *ans* 基因沉默后, 欧洲甜樱桃果实的着色表现出缺陷。

综上所述研究结果显示, TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实有效沉默了 *ans* 基因表达, 果实的果皮和果肉颜色呈现出显著的缺陷, 表明 TRV 介导的欧洲甜樱桃果实 VIGS 体系可有效降低欧洲甜樱桃果实内源基因的表达, 并呈现相应的表型。

3 讨论

目前, 基因功能的研究鉴定主要通过稳定的遗传转化(包括同源重组技术和 CRISPR/Cas9 技术)和突变体的表型分析鉴定等途径实现^[16-17]。但是, 对于



A~B. 侵染 14 d 后, 欧洲甜樱桃果实的果皮表型; C~D. 侵染 21 d 后, 欧洲甜樱桃果实果皮表型; E. 侵染 28 d 后, 欧洲甜樱桃果实果皮和果肉表型。

A-B. 14 d post inoculation, the skin color phenotype of the sweet cherry fruit; C-D. 21 d post inoculation, the skin color phenotype of the sweet cherry fruit; E. 28 d post inoculation, the skin and pulp color phenotype of the sweet cherry fruit.

图 4 *ans* 基因沉默后欧洲甜樱桃果实的表型

Fig. 4 Phenotype observation of *TRV::00*- and *TRV::ANS*-silenced sweet cherry fruit

一些非模式植物, 尤其是果树等园艺作物由于其童期长, 果实发育关键基因功能的缺失往往影响果实的生长发育, 甚至不产生果实, 因此利用传统的转基因技术研究果实相关基因的功能具有一定的局限性。笔者利用 TRV 介导 VIGS 技术成功沉默欧洲甜樱桃果实的 *ans* 基因, 建立沉默欧洲甜樱桃果实的 VIGS 体系。尽管 VIGS 技术已经广泛应用于多种植物中^[18], 但利用 TRV 介导的农杆菌注射压迫法侵染欧洲甜樱桃果实的应用尚属首例, 这为欧洲甜樱桃基因功能研究提供了技术保障。

VIGS 沉默效果的影响因素很多^[19]。靶基因片段的长度、接种方法和时期、樱桃果实发育的培育条件(温度、湿度)等是影响 TRV 病毒诱导基因沉默欧洲甜樱桃果实效率的关键因素。前人研究已经确定插入片段 300~500 bp 的沉默效果最佳^[20], 笔者选择插入病毒载体的同源基因片段为 400 bp 左右。TRV 病毒具有寄主范围广, 可直接作用于宿主植物的 RNA, 沉默效率高、持续时间长、且病毒症状轻等特点, 所以选用 TRV 介导, 选取花后 14 d 花生粒大的

欧洲甜樱桃果实注射, 采用压迫注射法从甜樱桃果实的果柄处注射, 看到果实组织中果实表面颜色改变表示注射液扩散到果实组织。由于樱桃果实组织的维管束组织较少, 可能会限制病毒在果实中扩散, 因此 TRV::ANS 侵染的欧洲甜樱桃果实的表型缺陷仅表现在局部, 因此本研究所提取的 RNA 也是选择侵染部分为材料。

4 结 论

成功建立了欧洲甜樱桃果实 VIGS 体系, 对开展欧洲甜樱桃果实相关基因的功能研究具有重要意义, 为解析果实品质形成的分子机制奠定了基础, 同时也为其他果树开展相关研究提供了借鉴与思路。

参考文献 References:

- [1] LI B, XIE Z, ZHANG A, XU W, ZHANG C, LIU Q, LIU C, WANG S. Tree growth characteristics and flower bud differentiation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) under different climate conditions in China[J]. Horticultural Science, 2010, 37(1): 6-13.

- [2] 李坤坤,徐昌杰.蔷薇科果树离体再生与遗传转化研究进展[J].园艺学报,2017,44(9): 1633-1644.
LI Kunkun, XU Changjie. Advances in regeneration and genetic transformation of Rosaceae fruit trees[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(9): 1633-1644.
- [3] 王新平,茹慧玲,孙慧英,王新生,杨兆亮,杨雪瑞.果树转基因研究进展[J].山西农业科学,2016,44(1): 123-125.
WANG Xinping, RU Huiling, SUN Huiying, WANG Xinsheng, YANG Zhaoliang, YANG Xuerui. Research progress of transgenic fruit trees[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016, 44(1): 123-125.
- [4] GAMBINO G, GRIBAUDO I. Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges[J]. Transgenic Research, 2012, 21(6): 1163-1181.
- [5] 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.
- [6] 宋震,李中安,周常勇.病毒诱导的基因沉默(VIGS)研究进展[J].园艺学报,2014,41(9): 1885-1894.
SONG Zhen, LI Zhong'an, ZHOU Changyong. Research advances of virus-induced gene silencing (VIGS) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(9): 1885-1894.
- [7] LI H. BSMV-induced gene silencing assay for functional analysis of wheat rust resistance[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1659: 257-264.
- [8] MEI Y, ZHANG C, KERNODLE B M, HILL J H, WHITHAM S A. A foxtail mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in maize[J]. Plant Physiology, 2016, 171(2): 760-772.
- [9] ULLAH A, SUN H, HAKI M, YANG X, ZHANG X. A novel cotton WRKY gene, GHWRKY6 - like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species[J]. Physiologia Plantarum, 2018, 162(4): 439-454.
- [10] 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, 460/461: 154-164.
- [11] BENKOVICS A H, NYIKÓ T, MÉRAI Z, SILHAVY D, BISZTRAY G D. Functional analysis of the grapevine paralogs of the SMG7 NMD factor using a heterolog VIGS-based gene depletion-complementation system[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(3): 277-290.
- [12] 熊作明,周春华,陶俊.不同类型枇杷果实着色期间果肉类胡萝卜素含量的变化[J].中国农业科学,2007,40(12): 2910-2914.
XIONG Zuoming, ZHOU Chunhua, TAO Jun. Changes of carotenoid content in pulp of different loquat types during fruit coloring[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(12): 2910-2914.
- [13] 张东,滕元文.红梨资源及其果实着色机制研究进展[J].果树学报,2011,28(3): 485-492.
ZHANG Dong, TENG Yuanwen. Germplasm resources of red pears and research progress in pear coloring mechanism[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(3): 485-492.
- [14] JIN W, WANG H, LI M, LI M, WANG J, YANG Y, ZHANG X, YAN G, ZHANG H, LIU J, ZHANG K. The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(11): 2120-2133.
- [15] 元希武,帅琴,范丽,曾其伟,向仲怀,何宁佳.桑树花青素合成酶(ANS)基因的克隆及在2种果色桑树中的表达特征[J].蚕业科学,2013,39(1): 5-13.
QI Xiwu, SHUAI Qin, FAN Li, ZENG Qiwei, XIANG Zhonghuai, HE Ningjia. Molecular cloning and expressional pattern of anthocyanidin synthase gene in two mulberry species with different fruit colors[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(1): 5-13.
- [16] 姚冉,石美丽,潘沈元,沈桂芳,张志芳.农杆菌介导的植物遗传转化研究进展[J].生物技术进展,2011,1(4): 260-265.
YAO Ran, SHI Meili, PAN Shenyuan, SHEN Guifang, ZHANG Zhifang. Progress on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation[J]. Current Biotechnology, 2011, 1(4): 260-265.
- [17] 方锐,畅飞,孙照霖,李宁,孟庆勇. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术[J].生物化学与生物物理进展,2013,40(8): 691-702.
FANG Rui, CHANG Fei, SUN Zhaolin, LI Ning, MENG Qingyong. New method of genome editing derived from CRISPR/Cas9[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2013, 40(8): 691-702.
- [18] 季娜娜,闵德栋,邵淑君,李富军,张新华. VIGS 载体在蔬菜作物中的应用研究进展[J].植物生理学报,2016,52(6): 810-816.
JI Nana, MIN Dedong, SHAO Shujun, LI Fujun, ZHANG Xinhua. Progress of research on application of VIGS vectors in vegetables[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(6): 810-816.
- [19] 舒庆艳,朱瑾,门思琦,郝青,王倩玉,刘政安,曾秀丽,王亮生.基于牡丹类黄酮糖基转移酶基因建立 VIGS 技术体系[J].园艺学报,2018,45(1): 168-176.
SHU Qingyan, ZHU Jin, MEN Siqi, HAO Qing, WANG Qianyu, LIU Zheng'an, ZENG Xiuli, WANG Liangsheng. Establishing virus induced gene silencing (VIGS) system in tree peony using PsUFGT genes[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(1): 168-176.
- [20] BURCH-SMITH T, ANDERSON J, MARTIN G, DINESH-KUMAR S. Application and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. The Plant Journal, 2004, 39(5): 734-746.