

VIGS 技术的研究进展及其在葫芦科作物中的应用

刘 美, 刘莉铭, 吴会杰, 古勤生*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘 要: 病毒诱导的基因沉默(*Virus-induced gene silencing*, VIGS)是广泛存在的生物自然防御反应,通过 RNA 水平的转录后基因沉默(*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS)来抵御外来核酸,利用该机制已开发了适用于不同植物的基因功能组学研究载体。与基因敲除和遗传转化相比,VIGS 技术具有简便、高效和高通量等优势,但也受沉默效率以及沉默持续时间的局限。随着多种葫芦科作物基因组测序完成,亟待探明重要性状的基因功能,由于该类作物的遗传转化效率低,因而亟需开发适用的 VIGS 载体。笔者简述了 VIGS 技术的发展、优势、应用中存在的问题及葫芦科作物的 VIGS 载体技术。

关键词: 葫芦科作物;病毒诱导的基因沉默;基因功能;病毒载体

中图分类号: S642

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)11-1422-08

Research progress in VIGS technology and its application in Cucurbitaceae crops

LIU Mei, LIU Liming, WU Huijie, GU Qinsheng*

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

Abstract: Gene silencing comprises transcriptional gene silencing (TGS) and post-transcriptional gene silencing (PTGS). Virus-induced gene silencing (VIGS) is a natural defense reaction that exists extensively in organisms. It resists foreign nucleic acids through PTGS at RNA level. This mechanism has been explored in the development of vectors for gene verification. PTGS was first discovered in plants and described as co-suppression. Since then, it has also been found in fungi and animals, and the term was subsequently applied almost exclusively to techniques involving recombinant viruses to knock down the expression of endogenous genes. Because it can specifically silence a specific gene, leading to the loss of function of this gene, the potential of VIGS as a tool to analyze gene function is recognized quickly. Although there are many articles on the mechanism of VIGS, the specific way of action of key genes (such as the DCL gene) in the silent pathway and its effect on silencing efficiency are still not clear. Therefore, in order to better apply the VIGS technology and develop more and more optimized VIGS vectors, it is necessary to deeply study the mechanism of action of PTGS. The simplest and most effective way to determine the function of a gene or protein is to attenuate the expression of a gene or to produce a mutant that does not encode a functional protein, and the most mature technologies for studying loss of plant function are chemical mutagenesis, transposons, and insertion of T-DNA to create disruption in the coding sequence. However, all these methods require tedious processes, which are time-consuming and labor-intensive and have very low conversion efficiency. However, VIGS can overcome these deficiencies and be seen as an alternative approach to those traditional methods. It can identify the loss-of-function phenotype of a particular gene in a single generation. Through the use of targeting se-

收稿日期: 2018-05-28 接受日期: 2018-08-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31572147); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2018-ZFRI)

作者简介: 刘美, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为西甜瓜病虫害防控。Tel: 13121208699, E-mail: lmvirus@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330997, E-mail: guqinsheng@caas.cn

quences from the most highly conserved regions of the gene family, all or most of the members of a given family can be silenced to resolve complications due to the presence of gene families. It does not need to go through genetic transformation and it is a transient method. According to the latest statistics by the FAO in 2016, the output of Chinese cucurbit crops such as watermelons, melons, and cucumbers has increased yearly in the past decade and has played an important role in Chinese fruits and vegetables. China has a long history of cultivation of cucurbit crops. With the improvement of the level of agricultural production and consumers' pursuit of high-quality melon vegetables, it is urgent to utilize genes for important agronomic traits of cucurbit crops to cultivate excellent, disease-resistant and characteristic varieties. The genome sequencing of cucumber, watermelon, melon and other cucurbit crops has laid the foundation for excellent gene mining and gene function research. The genetic transformation of cucurbit crops is time-consuming and labor-intensive, and the transformation efficiency is extremely low. The establishment of the VIGS technology platform facilitates the use of VIGS technology for the study on gene function and accelerates the research of functional genomics in cucurbit crops, thus promoting the sustainable development of the cucurbit crop industry in China. Therefore, VIGS technology has a good prospect to be applied in cucurbit crops. Until now, only two VIGS vectors have been used in cucurbit crops, namely apple latent flat virus (ALSV) and tobacco ringspot virus (TRSV) based VIGS vectors. Although the VIGS system has been successfully applied in many crops as well as model plants such as *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana*, some factors such as the limitation of the host range of the vector, the selection of effective target gene fragments, and the instability of the silencing efficiency are still the main concern. The construction strategy of VIGS vector and the factors affecting the efficiency of silencing are also briefly summarized. Meanwhile, the the problems that need to be solved in the future are also prospected. Developing a vector with broader host range and improving vector silencing efficiency will be a major direction for future research. Moreover, the selection of the target gene fragment for insertion into the vector also requires the exploration of more efficient fragments based on the different vectors. In addition, there are certain limitations on the location and the duration of silence, which requires further exploration. There are tremendous researches in VIGS technology. This article gives a brief overview of the development, mechanism and relative advantages of VIGS, and discusses some problems existing in the technology. The VIGS vector used in cucurbit crops is also introduced.

Key words: Cucurbitaceae crops; Virus-induced gene silencing; Gene function; Viral vector

基因沉默分为转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)属于转录后水平的基因沉默,是发生在RNA水平能使细胞中与目的基因序列一致或同源的mRNA序列降解的共抑制现象。为获得抗病毒植物,病毒外壳蛋白基因被整合到植物基因组中,事实证明,不需要翻译成蛋白质的植物病毒基因片段足以保护植物免受病毒感染^[1]。现在利用该机制开发了一种通过将目的基因片段插入合适的病毒基因组中构建重组病毒载体来抑制植物内源基因表达的反

向遗传学技术。由于该技术与基因敲除和遗传转化等传统基因功能验证技术相比具有高效、快速等优势,新的VIGS载体不断被开发,从而在植物基因组功能组学研究中应用越来越广泛。

葫芦科植物包括118属825种,广泛分布于热带和亚热带地区^[2]。我国有32属154种35变种,主要分布于西南部和南部^[3]。常见的有西瓜(*Citrullus lanatus*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、瓠瓜(*Lagenaria siceraria*)和西葫芦(*Cucurbita pepo*)等水果和蔬菜作物^[4]。根据FAO组织2017年最新统计的数据,2006年到2016年近十年中国西瓜、甜瓜和黄瓜的产

量逐年增加,在我国水果和蔬菜中占有重要地位。我国栽培葫芦科作物历史悠久,随着农业生产水平的提高和人们对高品质瓜类蔬菜的追求,急需挖掘葫芦科作物重要农艺性状的基因以培育优异、抗病和特色品种。黄瓜、西瓜和甜瓜等多种葫芦科作物基因组测序的完成奠定了优异基因挖掘和基因功能研究的基础,葫芦科作物遗传转化耗时费力且转化效率极低,VIGS技术平台的建立为葫芦科作物功能基因组学的研究提供便利,加速该领域的研究,从而促进我国葫芦科作物产业的可持续发展。

国内外关于VIGS技术研究进展的综述已有很多,笔者对VIGS的发展、作用机制和相对优势做了简要概述,并分析了该技术存在的一些问题,对葫芦科作物中应用的VIGS载体进行了介绍。

1 VIGS技术的发展

1.1 VIGS的发展

植物病毒作为最具破坏性的植物病原体之一,对作物生产造成了严重的危害。为了降低损失,科学家一直致力于研究寄主对病毒的反应以求培育出抗病毒作物。早期研究表明,植物受到病毒侵染后能对与其相同或亲缘关系相近的病毒株系产生抗性,这种现象被称为“交叉保护”^[5]。长期以来,人们发现植物受病毒侵染发病后,其新生的叶片并不出现症状,而且同种病毒也不再侵染这些植株的新生叶片,该现象被称之为恢复,后续研究推测RNA沉默可能是造成这一现象的原因。PTGS最先在植物中被发现并描述为共抑制^[6-7],后来在真菌和动物中也相继被发现,之后该术语几乎全部用于描述为降低内源基因表达的重组病毒的技术^[8-9]。由于它可以使特定基因沉默,导致该基因的功能丧失,因此,VIGS作为分析基因功能的工具的潜力很快被认可^[8]。从VIGS载体被开发以来,广泛应用于验证植物基因功能,包括代谢途径、基本细胞功能、植物与微生物的互作、非生物胁迫耐受性的基因以及细胞过程尤其是干旱和氧化应激中。

1.2 VIGS的技术原理

VIGS是一种防御病毒入侵的机制,用于表征植物基因功能的基因转录抑制技术。在病毒的复制期间,引发PTGS的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)由依赖RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP)产生,然后该dsRNA

被Dicer-like protein(DCL)切割产生称为小干扰RNA(small interfere RNA, siRNAs)的分子,siRNA的反义链结合并激活RNAi沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)以靶向同源RNA降解^[10]。关于DCL基因的研究,在拟南芥中发现有4个DCL基因(DCL1、DCL2、DCL3和DCL4)参与了PTGS,DCL1能产生21 nt的微小RNA(micro RNA, miRNA),DCL2、DCL3和DCL4能将外源的dsRNA分别切割成22 nt、24 nt和21 nt的siRNA^[11]。虽然在正链RNA病毒侵染的拟南芥中已被证明DCL4对21 nt小片段siRNA的产生起主导作用^[12-13],但在其他植物中的情况还没有确切的解释,siRNA的产生主要由哪一种DCL基因决定可能取决于病毒的类型和植物种类^[14]。尽管目前对VIGS机制阐述的文章有很多,但是对于沉默途径中关键基因的具体作用方式及其对沉默效率的影响机制尚不够清楚。因此,为更好地应用VIGS技术,开发更多更适用的VIGS载体,需要进一步深入研究PTGS的作用机制。

2 VIGS的优点

确定基因或蛋白质功能最简单有效的方法是通过化学诱变、转座子和T-DNA插入等方法来破坏编码序列,从而减弱基因的表达或产生不编码功能性蛋白质的突变体。虽然这些技术已被广泛的成功使用,但是这些技术均需要大量的群体来筛选突变的目的基因^[15-16],这是一个非常耗时的过程;其次,由于植物基因组中存在大量的基因家族和基因重复,许多点突变和插入不会产生明显的表型^[15],而且结果会使许多突变遗漏,导致无法揭示所研究基因的功能。最后,当在T-DNA或转座子插入序列中鉴定到突变时,它们可能不是单独发生的,而是在第二个或多个其他插入的情况下发生,使敲除表型的解释复杂化^[17]。为了从其他未连锁的突变中分离所需的突变,通常需要进行多次回交,这一过程是费力且费时的。而使用转基因的方法来验证基因功能被限制在一些易于遗传转化的物种中,而且耗时费力,转化效率低^[18]。VIGS克服了这些不足,可以被看作是对传统方法的补充。

2.1 VIGS可快速鉴定一个基因功能

VIGS被作为功能基因组学工具的一个显著优势是目的基因可以在VIGS中直接靶向,不需要筛

选大群体来鉴定特定基因中的突变,它可以在一代中鉴定特定基因的功能丧失表型。例如,VIGS 技术在番茄抗叶霉病的应用中,沉默了 NRC1 基因(NB-LRR protein required for HR associated cell death 1),从而抑制了抗叶霉病基因(Cf-4)和病菌无毒基因(Avr4)的互作,说明 NRC1 基因是番茄抗叶霉病菌反应中所必须的^[19]。

2.2 VIGS 克服了功能冗余

由于存在基因家族而导致冗余的问题可以通过使用 VIGS 来解决。通过使用来自基因家族的最高度保守区域的靶向序列,可以使靶向基因家族的全部或大部分成员沉默^[20]。关于高通量病毒诱导的基因沉默揭示热激蛋白 90(Heat shock protein 90, HSP90)在植物抗病性作用的研究中表明,在 PVX 病毒载体中插入 HSP90 基因家族中高度保守的编码序列区域 9-037-1 和 10-186,可使所有 HSP90 mRNA 沉默,通过蛋白质印迹法分析,被携带插入片段的 PVX 载体侵染的组织中不存在 HSP90^[20]。

2.3 VIGS 避免了遗传转化

VIGS 是一种瞬时的方法,不需要遗传转化,转基因在许多植物物种中是困难的。葫芦科作物的遗传转化耗时费力、转化效率极低,虽然首例转基因西瓜材料早在 1994 年被报道^[21],但仍然存在转化效率低而难于成为基因功能验证的平台技术。VIGS 通常在幼小的植物或成熟的幼苗中进行,在发育的早期阶段使功能丧失表型的植物死亡常常不可避免,此类基因就难于采用转基因的方法来验证,这可能意味着 VIGS 可以研究更多具有发育作用的基因。

3 VIGS 载体在葫芦科作物中的应用

迄今,应用于葫芦科作物上的病毒载体只见基于苹果潜隐球形病毒(*Apple latent spherical virus*, ALSV)和烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)构建的 VIGS 载体。

3.1 ALSV 载体

ALSV 从日本的苹果树中分离出来,属于新建立的樱桃锉叶病毒属(*Cheravirus*)^[22],病毒颗粒直径为 25 nm,包含 2 条正义单链 RNA 分子(RNA1 和 RNA2)。RNA 1 含 6 813 bp[不包括 3' poly(A)尾],具有编码 243K 多肽的单个开放阅读框(open reading frame, ORF),含蛋白酶辅助因子、NTP 结合解旋酶、半胱氨酸蛋白酶和来自 N 端的 RNA 聚合酶;除

了 3' poly(A)尾之外, RNA 2 含 3 385 bp,编码 119K/108K 多肽的单个 ORF,其在 N-末端包含 53K/42K 运动蛋白(move protein, MP)和 C 末端的 3 个外壳蛋白(Vp25、Vp20 和 Vp24)^[23]。

含有花椰菜花叶病毒 35S 启动子的 ALSV-RNA1 和-RNA2 的侵染性 cDNA 克隆在 2004 年被成功构建,然后将 ALSV-RNA2 的侵染性 cDNA 克隆构建成表达载体,该 ALSV-RNA2 载体可用于植物中外源基因的稳定表达^[24]。表达荧光蛋白的 ALSV 载体用于追踪 ALSV 的细胞间移动并分析在共侵染植物中用青色和黄色不同荧光蛋白标记的同一和两个不同病毒群的空间分布^[25-26]。虽然苹果是 ALSV 唯一已知的自然寄主,但它的实验寄主比较广泛,包括拟南芥、茄科植物、葫芦科植物、豆科植物和蔷薇科的果树^[27-28]。ALSV 潜伏侵染这些大多数实验寄主无明显症状,适合于 VIGS 载体构建,ALSV 病毒载体也是首次报道可用于葫芦科作物的 VIGS 载体^[27]。克隆黄瓜叶片中的八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)和 SU 基因(300 bp),将其重组到 ALSV-RNA2 中 MP 和 Vp25 之间,分别构建了 ALSV-PDS 和 ALSV-SU 载体,然后采用农杆菌浸润转化的方法将重组载体分别接种到黄瓜、香瓜、西葫芦、西瓜、葫芦和丝瓜的子叶中,结果发现,所有接种 ALSV-PDS 载体的葫芦科作物均出现与 PDS 基因被敲除一样的光漂白表型,表明被接种物种中内源 PDS 基因已被沉默;类似地,接种了 ALSV-SU 载体的植物产生了典型的 SU 基因被抑制的黄叶表型,表明 SU 基因已经被沉默;但是用相同方法处理南瓜子叶,未出现明显的沉默表型^[27]。

虽然 ALSV 具有寄主范围广、能系统侵染且不会产生严重症状等适合构建 VIGS 载体的特点,但是其病毒基因组的表达模式限制了其在 VIGS 技术中的应用。ALSV 病毒的 RNA 在翻译时先合成 1 个多聚前体蛋白,须由专一的蛋白酶加工裂解,才能成为成熟的蛋白质,所以 ALSV 在高通量的表达植物基因组方面受到了限制^[29]。

3.2 TRSV 载体

TRSV 是线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*),病毒颗粒直径为 28 nm,基因组由 2 条正义单链多聚腺苷酸化的 RNA 分子(RNA1 和 RNA2)组成,分别翻译一个多聚蛋白,随后被病毒蛋白酶加工成几种蛋白^[30]。RNA1 含 7 513 nt[除了 3' 末端 poly(A)尾],可

编码 255.5 ku 的 2 035 个氨基酸的多聚蛋白,该蛋白被切割成 5 种成熟蛋白,分别为蛋白酶辅因子(P1A)、解旋酶(Hel)、基因组连接蛋白(VPg)、蛋白酶(Pro)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(Pol);RNA2 含 3 928 nt[除了 3' 末端 poly(A)尾],被翻译成含 1 100 个氨基酸的多聚蛋白(122.2 ku),该蛋白被蛋白酶水解成 3 个蛋白,分别为在 N 端参与 RNA 复制的 P2A、MP 和外壳蛋白(coat protein, CP)^[30]。

TRSV 寄主范围很广,能够感染草本和木本植物,在烟草、大豆、番茄、葫芦、蓝莓和葡萄树中引起非常严重的病毒症状。TRSV 引起大豆芽枯病导致严重的产量损失和劣质的种子^[31]。尽管 TRSV 已在多个寄主植物中检测到,但在 GenBank 中可用的全基因组序列少。以前的研究报告了 TRSV 大豆分离物的全基因组序列,基于此构建了具有生物活性的侵染性克隆,将 TRSV 的 RNA1 和 RNA2 的 cDNA 分别克隆到紧接双 CaMV 35S 启动子下游和胭脂碱合酶终止子上游的二元载体 pPZP211 中,共接种 7 d 后,在烟草表现明显的系统侵染,随后用从 TRSV 农杆菌浸润接种的本氏烟草叶制备的汁液接种大豆、番茄和拟南芥,也表现出与野生型一样的症状^[30]。该侵染性克隆的构建将有助于研究基于 TRSV 的病毒载体在植物中的外源基因表达和 VIGS 载体的开发。2016 年在 TRSV 侵染性克隆基础上将其成功改造为 VIGS 载体,并应用于本生烟、拟南芥、豆科以及葫芦科作物中,这个 VIGS 载体不仅用于营养组织、也适用于花和果实等生殖器官的内源基因沉默^[32]。

在葫芦科作物中,将黄瓜叶片中的 PDS 基因片段(300 bp)插入到 TRSV 病毒中,构建了 TRSV-PDS 载体,分别接种厚皮甜瓜、薄皮甜瓜和黄瓜,结果发现接种植株的上部叶片中均可出现光漂白现象,由于 TRSV 的侵染性克隆在西瓜中没有侵染性,因此该载体在西瓜中并不适用^[32]。

综上所述,病毒的侵染性克隆是构建 VIGS 载体的基础,黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)寄主范围广,分子质量小,在葫芦科作物中能进行系统侵染,笔者实验室已成功构建该病毒的侵染性克隆,全长 11 kb,普通的 PCR 扩增就能完成该基因的定点突变或基因重组^[33],用于弱毒株突变体的筛选,为 VIGS 体系平台的创制奠定了基础。目前在 CGMMV 侵染性克隆的基础上已经成功构建基于 CGMMV 的 VIGS 载

体,为葫芦科作物基因功能研究提供平台技术。

4 存在的问题与展望

4.1 载体病毒寄主范围的限制

虽然 VIGS 载体在不同植物中已经日渐成熟,但仍存在着载体的寄主范围局限、有效目的基因片段的选择以及沉默效率不稳定等问题,使得能应用在大麦、玉米等主要经济作物以及瓜果、蔬菜等园艺作物上的 VIGS 载体还很少,难于满足植物基因功能的研究。将苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AIMV)的外壳蛋白基因片段重组到有缺陷外壳蛋白基因的烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)中,使得支持嵌合型烟草花叶病毒的长距离运动,而且嵌合型烟草花叶病毒的寄主范围也扩大到包含 TMV 和 ALMV 的寄主,但此方法由于载体中双 CP 亚基因组启动子序列的高频同源重组,导致外源基因极易丢失^[34]。

因此,利用重组的方法组装为嵌合型病毒载体扩大其寄主范围,此技术需进一步探索;开发致病力低、寄主范围广的全新病毒载体成为我们今后亟需优化及解决的问题。随着 VIGS 技术越来越成熟,相信将会有更多的病毒载体被开发与应用。

4.2 目的基因片段的选择

在 VIGS 载体中所插入目的基因片段的长度、方向和序列都会影响沉默效率。插入基因片段过长,可能导致病毒不会系统移动,而太短则可能不能产生有效的 siRNA,而且可能较快丢失^[35]。将不同长度的烟草 PDS 基因片段插入 TRV 载体中,当插入的烟草 PDS 基因片段的长度为 200~1 300 bp 均能产生较好的沉默表型^[36];而将不同长度的 PDS 基因片段插入基于 PNRSV 病毒构建的载体中发现,当基因片段长度为 100~200 bp 时能出现光漂白,大于 200 bp 时,插入的 PDS 基因片段会丢失^[37]。因此,插入目的基因片段的长度还需依照不同病毒载体做具体探究。

目的基因插入片段的方向对沉默效率的影响也是一个值得深究的问题。克隆 60 bp PDS 的反向重复序列,将正向与反向片段同时插入谷子花叶病毒(*Foxtail mosaic virus*, FoMV)载体中,接种 21 d 后能出现光漂白现象^[38]。基于菜豆荚斑病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)构建的载体,将正向与反向目的基因片段分别插入载体中,发现反向插入能获

得更高的沉默效率^[39],而将同一片段的PDS以正向和反向插入TRSV构建的载体中发现均能产生光漂白现象,沉默效率无显著差异^[32]。因此,插入目的基因片段方向对沉默效率的影响可能也取决于病毒载体本身的属性,也可能与是否能产生发夹环状的dsRNA结构有关,但具体机制尚未阐明。

此外,在对插入片段序列进行选择时,需考虑插入片段是否可产生有效的siRNAs以及脱靶沉默问题。在PTGS作用过程中,siRNA由于存在非特异性,可能会与基因组内非靶标基因以外的其他基因作用而阻断基因的表达,产生意外结果,该现象则为siRNA脱靶效应^[40]。设计合理的siRNA^[41]、化学修饰使siRNA失去与RISC的结合能力^[42]、降低siRNA的浓度^[43]和将同一靶标基因设计成几条不同的siRNA并将其按特定的比例混合形成“siRNA pool”可降低脱靶效应的发生^[44]。

为防止产生脱靶沉默,保证VIGS载体的沉默效果,在选择插入基因片段的序列时,需要考虑插入的基因片段是否能产生21~24 nt有效的siRNAs并且要保证该基因片段不会与基因组内其他非靶标基因序列有同源性。目前人们对脱靶效应的发生机制尚不完全清楚,预测脱靶效应主要预测可能存在的脱靶基因^[44]。可供预测脱靶现象的软件主要有SiRNA Scan (<http://vigs.solgenomics.net>)、Dsccheck、Sicheck等^[45-46]。

总之,虽然可对脱靶基因进行预测,但该方法还不能完全在试验中被证实,精准度相对较低。因此,关于脱靶效应的具体机制和预测技术需进一步探索与完善。

4.3 沉默效率

4.3.1 局部沉默 VIGS载体大多应用于植物叶片,在花和果实等繁殖器官上的研究还很少。TRSV载体可诱导烟草、甜瓜的花以及黄瓜的果实发生沉默^[32],为今后研究VIGS对植物繁殖器官的应用提供参考。VIGS经常引起植株各个部位的基因沉默效率不均一的现象,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,这均不利于试验结果的分析,特别是在沉默后产生不明显的表现型的情况下,这可能是由于外源基因插入影响了病毒的系统运动,导致植物靶基因沉默的系统性差,在设计试验时用可辨别表现型标记沉默区域来解决此问题^[34]。

4.3.2 沉默时间持续短 VIGS的沉默表型一般可维持1个月左右,由于插入目的基因片段的载体可能会影响病毒的滴度或者会发生同源重组导致外源基因序列逐渐丢失而不能保持持续存在,随着环境的变化以及植物的生长,沉默表型会逐渐衰减甚至消失,这对于生长周期长的园艺植物的研究是远不够的。通过利用二级结构预测网址(<http://mfold.rna.albany.edu/>)对原始雀麦花叶病毒(*Brome mosaic virus*, BMV)载体的RNA3进行序列分析,基于此预测对其在原有载体基础上进行修饰改造,发现修饰后的载体能产生和原有载体相似的病毒积累,而且插入外源基因能在载体中保持更长时间,沉默表型也在更多组织和叶片中可见^[47]。该载体的成功修饰为我们在研究中出现的插入基因片段不稳定的问题提供了依据,因此我们可以采用类似的生物信息方法用于其他VIGS载体的改善。

VIGS载体接种寄主植物后,基因沉默取决于病毒的传播和植物生长之间的动态相互作用,而这两者都可能受环境条件的影响。温度是影响病毒传播和靶基因有效沉默的最重要因素之一,在分析温度对黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)载体沉默效率的影响试验中,接种插入玉米PDS基因的CMV载体于玉米植株中,当在20 °C/18 °C条件下,光漂白表型最明显^[48]。而烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)载体在番茄中良好沉默表型的发生在21 °C或以下的温度,在本氏烟草中,温度在25 °C左右是合适的^[36]。由此可见,即使同一病毒载体在不同的寄主植物中要有效沉默的表型也需要不同的温度。关于湿度对VIGS沉默效率的影响也有相关的报道,例如由TRV介导的VIGS需要相对较低的湿度条件^[49]。因此,必须通过试验探究最佳的植物生长条件,在控制条件下摸索适合维持VIGS实验的环境条件。

5 结 论

VIGS技术已被广泛应用于植物抗病抗逆、生长发育以及代谢调控等生理途径相关基因的功能鉴定。VIGS技术最先只在本氏烟草、茄科植物和拟南芥中建立,现广泛扩展到小麦、玉米、水稻、番茄、葡萄、苹果、柑橘、葫芦科等作物。VIGS具有简便、高效和高通量等优势,但也受沉默效率以及沉默持续时间的局限。此前葫芦科作物中可用的VIGS载体

仅有 ALSV 和 TRSV 两种, 现笔者实验室成功构建了基于 CGMMV 的 VIGS 载体。VIGS 载体适用的作物受寄主范围限制, 开发适用范围广、沉默效率高和沉默时间持续长的载体将是今后该领域研究的重点。

参考文献 References:

- [1] LINDBO J A, DOUGHERTY W G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts[J]. *Virology*, 1992, 189(2): 725-733.
- [2] KYLE M M. Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding.[J]. *Quarterly Review of Biology*, 1993(4): 278.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科技出版社, 2004: 84.
The Flora of China Commission in Chinese Academy of Science. Flora of China[M]. Beijing: Scientific Technical Publishers, 2004: 84.
- [4] 郑棚峻, 张宇, 张松柏, 刘勇, 张德咏. 葫芦科作物重要种传病毒研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(3): 5-9.
ZHENG Pengjun, ZHANG Yu, ZHANG Songbai, LIU Yong, ZHANG Deyong. Advances in research on viruses of important species of cucurbit crops[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(3): 5-9.
- [5] MCKINEY H. Mosaic diseases of the Canary Islands, West Africa and Gibraltar[J]. *Agricultural Research*, 1929, 39(3): 557-578.
- [6] VANDER A R, MUR L A, BELD M, MOL J N, STUITJE A R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 291-299.
- [7] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279-289.
- [8] BAULCOMBE D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 1999, 2(2): 109-113.
- [9] RUIZ M T, VOINNET O, BAULCOMBE D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(6): 937-946.
- [10] WATERHOUSE P M, WANG M B, LOUGH T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses[J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 834-842.
- [11] AXTELL M J. Classification and comparison of small RNAs from plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64(1): 137-159.
- [12] FUSARO A F, MATTHEW L, SMITH N A, CURTIN S, DEDIC-HAGAN J, ELLACOTT G A, WATSON J M, WANG M B, BROANAN C, CARROLL B J, WATERHOUSE P M. RNA interfering-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway[J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(11): 1168-1175.
- [13] WANG X B, JOVEL J, UDOMPORN P, WANG Y, WU Q F, LI W X, GASCIOLLI V, VAUCHERET H, DING S W. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(4): 1625-1638.
- [14] 孙道阳. 矮牵牛转录因子 PhOBF1 和 PhERF2 影响病毒诱导基因沉默效率的机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
SUN Daoyang. The study on the effects and mechanism of petunia transcription factors PHOBF1 and PHERF2 on virus-induced gene silencing efficiency[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016.
- [15] BOUCHE N, BOUCHEZ D. *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(2): 111-117.
- [16] PARINOV S, SUNDARESAN V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(2): 157-161.
- [17] HENIKOFF S, COMAI L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 375.
- [18] HILSON P, ALLEMEERCH J, ALTMANN T. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications[J]. *Genome Research*, 2004, 14(10B): 2176-2189.
- [19] GABRIELS S H E J, VOSSSEN J H, EKENGREN S K. An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra and intracellular resistance proteins[J]. *Plant Journal*, 2007, 50(1): 14.
- [20] LU R, MALCUIT I, MOFFETT P, RUIZ M T, PEART J, WU A J, RATHJEN J P, BENDAHMANE A, DAY L, BAULCOMBE D C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 11: 5690-5699.
- [21] CHOI P S, SOH W Y, KIM Y S, YOO O J, LIU J R. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(6): 344-348.
- [22] LE G O, SANFACON H, IKEGAMI M. Cheravirus and Sadwavirus: two unassigned genera of plant positive-sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus *Nepovirus* (family Comoviridae)[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(9): 1767-1774.
- [23] LI C, YOSHIKAWA N, TAKAHASHI T. 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.
- [24] LI C, SASAKI N, ISOGAI M. Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors[J]. *Archives of Virology*, 2004, 149(8): 1541-1558.

- [25] YOSHIKAWA N, OKADA K, ASAMUMA K. A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of apple latent spherical cheravirus[J]. Archives of Virology, 2006, 151(5): 837-848.
- [26] TAKAHASHI T, SUGAWARA T, YAMATSUTA T, ISOGAI M, NATSUAKI T, YOSHIKAWA N. Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants[J]. Phytopathology, 2007, 97:1200-1206.
- [27] 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.
- [28] SASAKI S, YAMAZGISHI 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):15-25.
- [29] NAKATSUKA T, SAITO M, YAMADA E, FUJITA K, YAMAGISHI N, YOSHIKAWA N, NISHIHARA M. Isolation and characterization of the C-class MADS-box gene involved in the formation of double flowers in Japanese gentian[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 182-195.
- [30] ZHAO F, HWANG U S, LIM S. Complete genome sequence and construction of infectious full-length cDNA clones of tobacco ringspot nepovirus, a viral pathogen causing bud blight in soybean[J]. Virus Gene, 2015, 51(1): 163-166.
- [31] DEMSKI J W, KUHN C W. Tobacco ringspot virus[M]// HARTMA G L. Compendium of Soybean Diseases. 3rd ed. Saint Paul: Phytopathological Society, 1989: 57-59.
- [32] ZHAO F, LIM S, IGORI D. Development of tobacco ringspot virus-based vectors for foreign gene expression and virus-induced gene silencing in a variety of plants[J]. Virology, 2016, 492: 166-178.
- [33] LIU L M, PENG B, ZHANG Z W, WU Y, MIRAS M, ARANDA M A, GU Q S. Exploring different mutations at a single amino acid position of cucumber green mottle mosaic virus replicase to attain stable symptom attenuation[J]. Phytopathology, 2017, 107(9):1080.
- [34] SPITSINS, STEPLEWSKI K, FLESHY N. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein in tobacco mosaic virus (TMV) deficient in the production of its native coat protein supports long-distance movement of a chimeric TMV[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(5): 2549-2553.
- [35] BURCH-SMITH T M. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. Plant Journal, 2004, 39(5): 734-746.
- [36] LIU E, PAGE J E. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus[J]. Plant Methods, 2008, 4(1): 5.
- [37] CUI H G, WANG A M. An efficient viral vector for functional genomic studies of Prunus fruit trees and its induced resistance to Plum pox virus via silencing of a host factor gene[J]. Plant Biotechnol Journal, 2017, 15(3): 344-356.
- [38] LIU N, XIE K, JIA Q, ZHAO J P, CHEN T Y, LI H G, WEI X, DIAO X M, HONG Y G, LIU Y L. Foxtail mosaic virus-induced gene silencing in monocot plants[J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 1801.
- [39] ZHANG C, BRADSHAW J D, WHITHAM S A, HILL J H. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing [J]. Plant Physiology, 2010, 153(1): 52-65.
- [40] 邹凌云, 王正志. siRNA 脱靶效应研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(4): 59-63.
- ZOU Lingyun, WANG Zhengzhi. Research progress of siRNA off-target effect[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(4): 59-63.
- [41] HAJERI P B, SINGH S K. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part Designing of siRNAs[J]. Drug Discovery Today, 2009, 14(17/18): 851-858.
- [42] BEHLKE M A. Chemical Modification of siRNAs for *in vivo* use [J]. Oligonucleotides, 2008, 18(4): 305-320.
- [43] SEMIZAROV D, FROST L, SARTHY A L. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(11): 6347-6352.
- [44] BROWN K, SAMARSKY D. RNAi off-targeting: Light at the end of the tunnel[J]. Journal of RNAi & Gene Silencing, 2006, 2(2): 175.
- [45] FERNANDEZ-POZO N, ROSLI H G, MARTIN G B. The SGN VIGS tool: user-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) constructs for functional genomics[J]. Molecular Plant, 2015, 8(3): 486-488.
- [46] 王锦达. 赤拟谷盗 RNAi 及 dsRNA 脱靶效应的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- WANG Jinda. Study on off-target effect of RNAi and dsRNA in pigupid[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [47] DING X S, MANNAS S W, BISHOP B A. An improved Bromovirus mosaic virus silencing vector: Greater insert stability and more extensive VIGS[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 496-510.
- [48] 王蓉. 用于玉米基因功能研究的黄拟谷盗病毒基因沉默载体的构建[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- WANG Rong. An efficient virus-induced gene silencing vector for maize functional genomics research[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.
- [49] 徐幼平, 徐秋芳, 宋晓毅. 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 Youping, XU Xiaofang, SONG Xiaoyi. Virus-induced gene silencing[J]. Journal of Zhejiang University (Agricultural and Life Sciences Edition), 2008, 34(2): 119-131.