

病毒诱导基因沉默技术在豆科植物中的应用

魏正欣¹, 孙虎¹, 向艳涛¹, 蒋浩中¹, 沙爱华^{1*}, 刘良军^{2*}

(1. 长江大学农学院/主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心/湿地生态与农业利用教育部工程研究中心, 湖北 荆州, 434025;
2. 湖北省农业科学院粮食作物研究所/粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室, 湖北 武汉, 430064)

摘要: 病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是一种基于转录后基因沉默的反向遗传学研究方法,用于快速鉴定基因功能。该技术具有实验周期短、操作简便、低成本、高效率、获得表型快以及高通量等优点,被广泛地应用于植物基因功能研究。豆科植物作为人类食品中淀粉、蛋白质、油和蔬菜的重要来源之一,具有重要的经济价值。本文从VIGS的技术原理、VIGS载体的开发和改良、VIGS在豆科植物中的应用等方面进行了综述,分析了VIGS技术在豆科植物中存在的问题,并展望了其应用前景。

关键词: 豆科植物;病毒诱导基因沉默;VIGS载体

中图分类号:S565.1:Q78

文献标识码:A

文章编号:1007-9084(2022)03-0497-06

Application of virus-induced gene silencing in legumes

WEI Zheng-xin¹, SUN Hu¹, XIANG Yan-tao¹, JIANG Hao-zhong¹, SHA Ai-hua^{1*}, LIU Liang-jun^{2*}

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, 434025, China; 2. Institute of Food Crop, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China)

Abstract: Virus induced gene silencing (VIGS) is a reverse genetics method based on post-transcriptional gene silencing. It can be used to identify gene function quickly. This technique has the advantages of short period of testing, simple operation, low cost, high efficiency, fastly obtaining phenotype, and high throughput. It has been widely used in gene function studying in plants. Legumes are of great economic significance as sources of starch, protein, oil and vegetables in human food. In the study, the application of virus-induced gene silencing technology in legumes was reviewed from technical principle, development and improvement vectors, and influencing factors of VIGS. The reviews will provide reference for conducting related studies by means of VIGS in leguminous plants.

Key words: Leguminous plants; virus-induced gene silencing; VIGS vectors

豆科(Leguminosae)植物约有690属,17 600余种,是双子叶种子植物,分布于世界各地,我国有1300多种。豆科植物中有许多种类是世界性的经济作物,与人类生活密切相关,如大豆、花生等,除此之外还有一些具有药用价值,如含羞草、决明、皂荚等。在过去的几十年里,分子生物学技术发展迅速,在模式植物研究中取得了巨大成就。然而,在与人类生活密切相关的农作物中,分子水平研究还有很大不足。转基因等多种分子生物学技术在大多数的植物中仍然存在着一些问题,需要进一步突破。近些年,病毒诱导基因沉默技术已成为研究热

点,可为植物基因功能研究提供强有力工具^[1]。

病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)是一种RNA介导的防御机制,即转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS),是植物体内普遍存在的遗传免疫机制^[2]。该技术利用携带植物功能基因cDNA的病毒,在侵染植物体后可诱导植物发生基因沉默从而引起表型改变,以通过植物表型或生理指标上的变化反映该基因的功能^[3],近年来已广泛地应用于植物基因功能的研究。与转基因等其它方法相比,VIGS具有简便高效、周期短、可沉默基因家族、不需获取转基因

收稿日期:2021-02-28

作者简介:魏正欣(1997-),女,硕士研究生,从事豆科植物功能基因组学研究,E-mail: 2545439813@qq.com

* 通讯作者:沙爱华(1973-),男,教授,博士,从事豆类作物育种及植物功能基因组学研究,E-mail: aihuasha@163.com;

刘良军(1963-),男,副研究员,从事作物育种研究,E-mail: liuliangjun1963@163.com

植株、高通量等优点,同时可在不同遗传背景的植物间进行基因功能比较,是研究功能基因组和特定基因功能的有效工具^[4]。目前已经普遍应用于烟草^[5]、拟南芥^[6]、棉花^[7,8]、番茄^[9]、马铃薯^[10]等植物基因功能的研究中。本文综述了近年来 VIGS 技术在豆科植物功能基因挖掘中的研究进展,旨在为进一步应用 VIGS 在豆科植物中开展相关研究提供借鉴。

1 VIGS 技术原理

基因沉默是植物界普遍存在的一种自我保护反应。在长期生物进化过程中,植物为了保护自身不受伤害而禁止外源核酸入侵,最终形成了这种保护机制。基因沉默发生在两种水平上,一种是转录水平上的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS),是 DNA 水平上基因调控的结果,主要是由启动子甲基化或导入基因异染色质化而导致的。另一种是转录后基因沉默(PTGS),是 RNA 水平基因调控的结果,在基因转录后水平上通过对靶 RNA 的特异性降解而使基因沉默。在这两种水平上引起的基因沉默都与入侵核酸片段和宿主基因的同源性有关^[11]。当病毒携带植物基因序列感染植物时,病毒感染会触发 VIGS。原理是携带目标序列病毒感染植物导致目标植物基因表达下调,使用来源于病毒的双链 RNA(dsRNA)作为模板产生小分子干扰 RNA(siRNA),而 siRNA 则将单链病毒 RNA 靶向并在特定序列中降解,因此,插入病毒基因组中的植物基因片段成为 siRNA 的来源,然后针对相应的植物基因 mRNA 进行破坏,由于宿主基因的功能丧失或表达降低,引起受感染植物的表型变化^[3]。VIGS 最早是在 RNA 病毒中发现,1995 年 Kmuagai 等^[12]首次将八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)的 DNA 片段插入烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV),再将重组 TMV 侵染烟草使得烟草叶片褪色,说明 TMV 成功沉默了 PDS 基因;1998 年 Ruiz 等^[13]在马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)上插入 PDS 的 DNA 片段,重组病毒侵染植物后也观察到叶片白化现象。说明植物内发生了基因沉默,使得 PDS 表达受抑制,产生白化现象。1999 年 Baulcombe 等^[14]研究发现 VIGS 机制中存在一种基因沉默信号 dsRNA(double strand RNA),使非侵染组织具有抗病能力。dsRNA 是基因沉默的关键起始因子,它可以通过病毒的复制机制、RNA 自我复制等策略产生^[15]。

VIGS 技术主要包括 3 个步骤:(1)对病毒基因

组进行改造,构建包含外源目标基因片段的病毒基因重组载体;(2)将其侵染宿主植物;(3)植物细胞识别入侵病毒,通过植物对病毒侵染的防御机制使目标基因沉默,表现出靶基因功能丧失和表达活性降低等表型,从而鉴定目标基因的功能^[16]。

2 VIGS 病毒载体的选择

病毒载体是携带外源目的基因进入动植物体内并有效表达的工具,可以在植物体中过表达或抑制基因表达。当基因被工程化到病毒基因组中时,植物病毒载体可以有效表达外源蛋白。随着病毒在宿主中复制,外源蛋白大量产生。根据构建 VIGS 载体的病毒性质,可以将其分为三大类:RNA 病毒载体、DNA 病毒载体和卫星病毒载体。

2.1 RNA 病毒载体

VIGS 中使用的病毒载体主要是 RNA 病毒载体,主要有烟草花叶病毒(TMV)、大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)、烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)、马铃薯 X 病毒(PVX)等十余种,其中 TMV 和 PVX 是最先被开发利用的 VIGS 载体,但是它们侵染后植物存在症状严重、基因沉默效率低、无持久作用等缺点。TRV 也是广泛应用于各种植物物种中最常见的病毒载体,它具有侵染后症状较轻,基因沉默效率高,可在多个组织产生沉默且效果长久等优点^[17]。BSMV 的病毒载体已成功应用于对小麦(*Triticum aestivum*)中非生物胁迫基因进行功能鉴定^[18]。苹果潜隐球形病毒(apple latent spherical virus, ALSV)已经成功在几种重要的作物如番茄、苹果、豆科植物、葫芦科等植物中应用^[3]。豌豆早枯病毒(pea early browning virus, PEBV)和豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus, BPMV)则是较早且成功应用于豆科植物 VIGS 中的病毒载体^[19]。

2.2 DNA 病毒载体

DNA 病毒也能诱导基因发生沉默, Kjemtrup 等^[20]人利用番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)有效沉默了增殖性细胞核抗原基因(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)。Tang 等^[21]人研究发现白菜卷叶病毒(cabbage leaf curl virus, CaLCuV)载体在植物中过度表达内源或人工 miRNA,能够诱导拟南芥中转基因与外源基因的沉默。多种 DNA 病毒被用来研究植物基因组功能,其中 CaLCuV 和 TYLCCNV(yellow leaf curl China virus)是最广泛使用的 DNA 病毒载体,已成功应用到烟

草、拟南芥、卷心菜和菜花中^[22]。与RNA病毒载体相比,DNA病毒VIGS载体具有构建简单、无需转录、操作简单、稳定性好等优点,但其基因沉默效率没有RNA病毒载体高^[23]。

2.3 卫星病毒载体

VIGS的卫星病毒载体是由病毒链的卫星病毒改造而来,Gossele等^[24]研究表明微卫星病毒载体STMV (satellite of tobacco mosaic virus)能够有效抑制烟草中PDS等13个内源基因,并引起明显的表型变化。Ju等^[25]首次发现病毒卫星DNA载体是一种有效的病毒诱导转录水平基因沉默载体,可用来研究植物基因组DNA甲基化。由于卫星病毒具有可以在植物中大量复制且自身基因组小,易操作等优点,已成为一种优良的VIGS载体,但同样存在基因沉默效率低的缺点^[23]。

3 VIGS在豆科植物中的应用

近年来,栽培大豆的基因组测序工作已完成,构建了野生大豆泛基因组,并不断地完善大豆种质资源的测序数据^[26]。近十几年来,已有诸如豌豆早枯病毒(PEBV)、豆荚斑驳病毒(BPMV)和苹果潜隐球状病毒(ALSV)等多种VIGS病毒载体成功应用于豆科植物基因功能的研究中,使得豆科植物这种遗传转化较难的物种的基因组学可以高效开展。目前,VIGS技术在豌豆中应用较多,以PEBV为载体的VIGS技术是研究豌豆发育途径功能基因调控的良好工具,且不会对豌豆开花及结荚成熟产生影响,不会影响豆科植物与根瘤菌共生形成根瘤^[27],具有广阔的开发前景。Gabriela等^[28]研究将携带PDS基因的cDNA片段插入到病毒载体的单链RNA2中,感染豌豆后成功沉默PDS基因,出现特征性的光漂白叶片;宋伟杰等^[29]成功地利用VIGS研究了豌豆基因PsPI(*Pisum sativum pistellata*)的功能,证明了PsPI基因具有拟南芥PI、金鱼草GLO同源基因的功能,为豌豆花发育调控基因的功能研究开拓新思路。此外,VIGS技术是进行植物基因功能鉴定的简便、高效的方式,目前已成功应用于豆科植物中。Ramegowda等在豌豆中使用了VIGS技术研究丛枝菌根真菌AMF中获取磷酸盐相关基因,沉默共生基因PsSym19,减少根皮层丛枝和囊泡的发育,揭示这些基因对豌豆中磷酸盐同化的重要性^[2];ATWOOD等^[30]将VIGS技术用于大豆中铁元素相关基因的功能分析中,沉默基因GmRPA3,沉默的植株叶片较小,叶绿素含量较高,对铁元素增加无响应,这表明

GmRPA3基因在铁的获取中发挥了作用;Cooper等^[31]利用豆荚斑驳病毒(BPMV)系统沉默Rpp1 (R-genes resistance to *P. pachyrhizi*),导致大豆丧失对根腐病的免疫功能,表明Rpp1基因调控的免疫途径以及相关基因与大豆防御系统紧密相关;使用VIGS技术沉默CHS基因使大豆种皮由棕变黄,表明CHS基因功能与色素合成有关^[32]。豆科植物中已成功构建了以ALSV、BPMV为载体的VIGS体系,并通过改良载体或接种方式以提高沉默效率。Lgarashi等^[33]从大豆植物中提取PDS基因与ALSV构建重组载体后分别侵染大豆、豌豆、菜豆和豇豆植株的第1片叶子,发现沉默植株的新生叶出现白化现象;Gedling等^[3]修改了基于ALSV载体的接种程序,使用大豆GmPDS1基因作为VIGS目标基因,在19种大豆基因型中评估了新方法的功效且获得明显的沉默表型;Zhang等^[34]研究改良BPMV载体,以提高BPMV载体对大豆功能基因组学的效率;Juvale等对不同时间和空间下BPMV基因沉默体系植株沉默情况研究中发现不同发育时期、不同组织的沉默效果不同,说明VIGS技术也可用于豆科植物组织水平研究^[35]。

4 VIGS技术在豆科植物中应用效率

4.1 VIGS载体插入目的基因片段长度及位置

较高的基因沉默效率是VIGS技术需要着重解决的问题。在VIGS过程中持续沉默的最重要因素可能是病毒感染期间载体中插入外源片段的遗传稳定性,而插入的目的基因片段序列和大小对VIGS沉默效率有一定影响。一般认为,比较理想的片段大小为150~500 bp^[36],插入靶基因片段长度与病毒在植物细胞间运动的限制有关,且在不同病毒和植物物种间可能存在差异^[37]。如在BMSV中分别插入PDS 275、400、584个核苷酸序列后,结果表明随序列长度增加,插入片段在接种植物的载体中稳定性越差,甚至插入片段丢失^[38]。Werner等^[39]构建ALSV载体时,目标基因序列约201 bp,较短则会降低沉默效率,较长则会导致不稳定,不能长久保持沉默。

VIGS的效果是基于序列同源性,两者序列同源性越高,基因沉默效果越好^[40]。另一个需要注意的问题是靶基因片段的区域选择。很多研究表明,选择不恰当的基因片段可能达不到基因沉默的效果,导致基因表型不正确,选择更为特异的片段可有效提高沉默效率^[41]。

4.2 病毒载体的选择及转化方法

目前VIGS技术应用的病毒载体大致为三类,包

括RNA病毒载体、DNA病毒载体和卫星病毒载体,但每种病毒载体适用寄主范围不同,沉默效果不同。因此,在VIGS技术中,所选择的病毒载体应是对实验植物有很好的侵染性、不产生致病表型,最好能在寄主植物中产生系统的沉默效果,以保证较高的基因沉默效率和持久的沉默表型^[38]。如何有效地将病毒载体导入植物细胞,是VIGS技术的关键。目前,已有注射渗透法^[42]、农杆菌渗透法^[43]、摩擦接种法^[3]、牙签刺伤法^[43]、真空渗透法^[44]等多种载体转化方式。其中注射渗透法可以精确传递接种物并引起有效且一致的基因沉默,农杆菌渗透法易于实施,可提高包括根在内的整个植株水平的基因沉默效率,但二者仅适用于少量植物;牙签刺伤法可用于大规模实验,这种方法容易且快速,成本适中收益较高。由于载体和植物种类,以及转接方式所呈现出的沉默效果不同,在实践中要根据植物和病毒载体的种类选择适宜的转接方式。因为ALS^V不容易感染园艺植物,所以在对园艺植物进行处理时常选择粒子轰击法,即以病毒RNA的形式进行接种,而不是通过摩擦接种或农杆菌浸润来接种^[45]。在基于CIYVV (Cloyer yellow vein virus), SMV 和 BPMV 载体的试验中,通过摩擦接种的方法成功地在大豆中进行了DNA克隆^[46], Zhang等^[47]人开发了一种在小麦和玉米发芽种子中通过真空和共培养农杆菌浸润的新方法。可以引发全植株水平的VIGS。在使用VIGS研究棉花基因*GhBI-1* (cotton Bax inhibitor-1)对盐胁迫的响应功能时,开发了棉花中的SSA-VIGS方法,通过将裸露的发芽种子浸入含有TRV-VIGS载体的农杆菌培养物中,在发育的早期引起叶和根中的基因沉默^[48]。

4.3 植物培养环境

植物的培养条件对于病毒的侵染、复制有一定的影响,所以在外部环境条件都适宜时,基因沉默的效果最好。温度是影响基因沉默效果的重要因素之一,不同载体的适宜温度不同,同一载体对不同寄主的适宜温度也不同,如TRV在本生烟上沉默的最适温度为25℃,而感染番茄的最适温度要低于或等于21℃^[17]。而卫星病毒载体对温度敏感性较低,TYLCCNV (tomato yellow leaf curl virus-china) 卫星病毒载体可在32℃发生基因沉默^[49]。湿度对VIGS沉默效果也有一定的影响, Fu等^[50]研究发现低湿度环境有利于TRV载体发生基因沉默。因此,在人工气候室中进行VIGS可以提高基因沉默效率。

5 VIGS技术在豆科植物中的局限和前景

VIGS技术与传统基因鉴定的方法相比,具有实验周期短、方法操作简单、成本低、高通量、获得表型快等优点,被广泛应用于植物的生长发育、抗病抗逆、代谢调控等生理过程的研究中。但是随着VIGS技术研究不断深入,也暴露出一定的局限性。例如基因沉默效率低、病毒症状明显、基因功能敲除不彻底、基因脱靶以及沉默不均一等问题。其中基因沉默不彻底是VIGS技术的最大问题,基因功能不能完全消除,VIGS技术难以对其功能进行鉴定^[51]。其次沉默效率低,在不同品种或组织中沉默效果不一致,可能使得试验结果在不同的品种或组织间有较大差异,可通过控制环境条件、改良载体或接种方式来提高基因沉默效率^[52]。提高VIGS在豆科植物中的基因沉默效率、开发新的病毒载体和接种方法将是一类研究目标,虽然VIGS技术在豆科植物中的应用还不成熟,但与传统方法相比优势显著,随着不断探索研究该技术必将逐步得到完善与发展,VIGS技术的诸多优点将会推动豆科植物研究的发展,打破传统研究的局限。

参考文献:

- [1] 吴燕, 刘咪, 陈明, 等. VIGS技术在观赏植物中的应用[J]. 分子植物育种, 2020, 18(3): 944-951. DOI: 10.13271/j.mpb.018.000944.
- [2] Ramegowda V, Mysore K S, Senthil-Kumar M. Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants[J]. Front Plant Sci, 2014, 5: 323. DOI: 10.3389/fpls.2014.00323.
- [3] Gedling C R, Ali E M, Gunadi A, et al. Improved apple latent spherical virus-induced gene silencing in multiple soybean genotypes through direct inoculation of agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* extract[J]. Plant Methods, 2018, 14: 19. DOI: 10.1186/s13007-018-0286-7.
- [4] 侯巧明, 张立, 贺新强, 等. 病毒诱导的基因沉默技术实验教学设计 and 实践[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(9): 191-193. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2015.09.051.
- [5] Hosseini Tafreshi S A, Shariati M, Mofid M R, et al. Heterologous virus-induced gene silencing as a promising approach in plant functional genomics[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3): 2169-2178. DOI: 10.1007/s11033-011-0965-1.
- [6] Reyes M I, Flores-Vergara M A, Guerra-Peraza O, et al. A VIGS screen identifies immunity in the *Arabidopsis*

- Pla-1 accession to viruses in two different genera of the Geminiviridae [J]. Plant J, 2017, 92 (5): 796–807. DOI:10.1111/tpj.13716.
- [7] Gao X, Wheeler T, Li Z, et al. Silencing GhNDR1 and GhMKK2 compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt[J]. Plant J, 2011, 66(2): 293–305. DOI:10.1111/j.1365-3113x.2011.04491.x.
- [8] 穆春, 安静, 李婷婷, 等. 应用病毒诱导基因沉默技术研究棉花 *GhAKT1* 和 *GhKT2* 基因的功能[J]. 棉花学报, 2017, 29(1): 40–49. DOI: 10.11963/issn.1002-7807.201701005.
- [9] 芦亮亮, 傅达奇, 刘海萍, 等. 番茄中维生素E合成相关基因的 VIGS 载体构建及侵染[J]. 北方园艺, 2011(16): 139–142.
- [10] 张晓梦, 张之为, 娜仁, 等. 马铃薯中 VIGS 沉默体系的研究[J]. 华北农学报, 2014, 29(1): 36–40.
- [11] 孙威, 许奕, 许桂莺, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 105–110. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.10.018.
- [12] Kumagai M H, Donson J, della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA [J]. PNAS, 1995, 92 (5): 1679–1683. DOI:10.1073/pnas.92.5.1679.
- [13] Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing [J]. Plant Cell, 1998, 10(6): 937–946. DOI:10.1105/tpc.10.6.937.
- [14] Baulcombe D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing[J]. Curr Opin Plant Biol, 1999, 2(2): 109–113. DOI:10.1016/s1369-5266(99)80022-3.
- [15] 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]. Genet Mol Res, 2004, 3(3): 323–341.
- [16] Becker A, Lange M. VIGS-genomics goes functional[J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(1): 1–4. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.09.002.
- [17] Broderick S R, Chapin L J, Jones M L. Virus-induced gene silencing for functional analysis of flower traits in *Petunia* [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2172: 199–222. DOI:10.1007/978-1-0716-0751-0_15.
- [18] Kang G, Li G, Ma H, et al. Proteomic analysis on the leaves of *TaBTF3* gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism [J]. J Proteomics, 2013, 83: 130–143. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.03.020.
- [19] Zhang C Q, Bradshaw J D, Whitham S A, et al. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing [J]. Plant Physiol, 2010, 153(1): 52–65. DOI:10.1104/pp.109.151639.
- [20] Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus [J]. Plant J, 1998, 14(1): 91–100. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00101.x.
- [21] Tang Y, Wang F, Zhao J P, et al. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants [J]. Plant Physiol, 2010, 153(2): 632–641. DOI: 10.1104/pp.110.155796.
- [22] Lee J, Cao D V, Kim J, et al. Development of a virus-induced gene silencing (VIGS) system for *Spinacia oleracea* L [J]. Vitro Cell Dev Biol Plant, 2017, 53(2): 97–103. DOI:10.1007/s11627-017-9806-9.
- [23] 姚丙晨, 孙玥, 孙林静, 等. 病毒诱导的基因沉默的发展及在植物生物逆境上的应用[J]. 中国农学通报, 2016, 32(9): 131–136.
- [24] Gossel   V, Fach   I, Meulewaeter F, et al. SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants [J]. Plant J, 2002, 32(5): 859–866. DOI:10.1046/j.1365-3113x.2002.01471.x.
- [25] Ju Z, Wang L, Cao D, et al. A viral satellite DNA vector-induced transcriptional gene silencing via DNA methylation of gene promoter in *Nicotiana benthamiana* [J]. Virus Res, 2016, 223: 99–107. DOI:10.1016/j.virusres.2016.07.005.
- [26] Li Y H, Zhao S C, Ma J X, et al. Molecular footprints of domestication and improvement in soybean revealed by whole genome re-sequencing [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 579. DOI:10.1186/1471-2164-14-579.
- [27] 王爽, 郭兵福, 郭勇, 等. 病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 技术及其在大豆基因功能研究和育种中的应用潜力 [J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 536–540. DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0536.
- [28] 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]. Plant J, 2004, 40(4): 622–631. DOI:10.1111/j.1365-3113x.2004.02233.x.
- [29] Song W E, Wang Z, Wang L L. Study a pea PI homolog function by VIGS [J]. Chin Sci Bull, 2007, 52(14): 1644–1648.
- [30] Atwood S E, O'Rourke J A, Peiffer 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. DOI:10.1111/pce.12147.
- [31] Cooper B, Campbell K B, McMahon M B, et al. Disruption of Rpp1-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing [J]. Plant Signal Behav, 2013, 8(12): e27543. DOI:10.4161/psb.27543.

- [32] Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, et al. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing [J]. Plant Biotechnol J, 2007, 5(6): 778–790. DOI:10.1111/j.1467-7652.2007.00288.x.
- [33] Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, et al. 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. DOI:10.1016/j.virol.2009.01.039.
- [34] Zhang C Q, Yang C L, Whitham S A, et al. Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean [J]. Mol Plant Microbe Int, 2009, 22(2): 123–131. DOI: 10.1094/MPMI-22-2-0123.
- [35] Juvalle P S, Hewezi T, Zhang C, et al. Temporal and spatial bean pod mottle virus-induced gene silencing in soybean [J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13(9): 1140–1148. DOI:10.1111/j.1364-3703.2012.00808.x.
- [36] Agüero J, Vives Mdel C, Velázquez K, et al. 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. DOI:10.1016/j.virol.2014.04.017.
- [37] 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. DOI:10.3969/j.issn.1000-4025.2012.02.032.
- [38] Ding X S, Mannas S W, Bishop B A, et al. An improved Brome mosaic virus silencing vector: greater insert stability and more extensive VIGS [J]. Plant Physiol, 2018, 176(1): 496–510. DOI:10.1104/pp.17.00905.
- [39] Werner Ribeiro C, Dugé de Bernonville T, Glévarec G, et al. ALSV-based virus-induced gene silencing in apple tree (*Malus × domestica* L.) [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2172: 183–197. DOI:10.1007/978-1-0716-0751-0_14.
- [40] Liu Y L, Nakayama N, Schiff M, et al. Virus induced gene silencing of a *DEFICIENS* ortholog in *Nicotiana benthamiana* [J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(5): 701–711. DOI:10.1023/B: PLAN.0000040899.53378.83.
- [41] 黄昌军, 钱亚娟, 李正和, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组研究中的应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(1): 1–15.
- [42] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. Nat Protoc, 2014, 9(7): 1549–1562. DOI:10.1038/nprot.2014.092.
- [43] Vaghchhipawala Z, Rojas C M, Senthil-Kumar M, et al. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses [J]. Methods Mol Biol, 2011, 678: 65–76. DOI:10.1007/978-1-60761-682-5_6.
- [44] 李聪聪, 安晓晖, 张中起, 等. 玉米 TRV-VIGS 的优化与顶腐病抗病基因的鉴定[J]. 核农学报, 2019, 33(11): 2111–2118. DOI: 10.11869/j. issn. 100-8551.2019.11.2111.
- [45] Li C, Yamagishi N, Kasajima I, et al. Virus-induced gene silencing and virus-induced flowering in strawberry (*Fragaria × ananassa*) using apple latent spherical virus vectors [J]. Hortic Res, 2019, 6: 18. DOI:10.1038/s41438-018-0106-2.
- [46] Seo J K, Lee H G, Kim K H. Systemic gene delivery into soybean by simple rub-inoculation with plasmid DNA of a Soybean mosaic virus-based vector [J]. Arch Virol, 2009, 154(1): 87–99. DOI: 10.1007/s00705-008-0286-4.
- [47] Zhang J, Yu D S, Zhang Y, et al. Vacuum and co-cultivation agroinfiltration of (germinated) seeds results in tobacco rattle virus (TRV) mediated whole-plant virus-induced gene silencing (VIGS) in wheat and maize [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 393. DOI: 10.3389/fpls.2017.00393.
- [48] Zhang J, Wang F, Zhang C, et al. A novel VIGS method by agroinoculation of cotton seeds and application for elucidating functions of GhBI-1 in salt-stress response [J]. Plant Cell Rep, 2018, 37(8): 1091–1100. DOI: 10.1007/s00299-018-2294-5.
- [49] Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, et al. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants [J]. Plant Physiol, 2005, 138(4): 1828–1841. DOI:10.1104/pp.105.066563.
- [50] Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, et al. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity [J]. Mol Cells, 2006, 21(1): 153–160.
- [51] 张琴琴, 纪兆林, 朱峰. 病毒诱导的基因沉默技术在双子叶植物中的应用研究进展[J]. 河南农业科学, 2020, 49(2): 1–8. DOI: 10.15933/j. cnki. 1004-3268.2020.02.001.
- [52] 蔡文, 陈长明, 陈国菊, 等. 病毒诱导基因沉默技术在茄科植物功能基因组学研究中的应用进展[J]. 辣椒杂志, 2017, 15(1): 1–12. DOI: 10.16847/j. cnki. issn.1672-4542.2017.01.001.

(责任编辑:胡志勇)