

VIGS 技术在观赏植物中应用的研究进展

陈 峥, 辛丽琴, 吴超群, 王青青, 何少云

(华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

摘 要:病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术,具有周期短、成本低、不需要转化遗传、高通量等优势,而被广泛地应用于探究植物生长发育、抗病及生理代谢等相关基因功能的鉴定。观赏植物具有较高的经济效益,VIGS 技术在观赏植物中的应用具有良好的前景。现通过综述 VIGS 技术的建立与发展、作用机制及在观赏植物基因功能鉴定的应用实例,探讨该技术应用于观赏植物中影响沉默效率的因素;并展望其在观赏植物保护、丰富观赏性状的分子育种领域方面的应用前景。

关键词:病毒诱导基因沉默(VIGS);观赏植物;基因功能;病毒载体

中图分类号:S 68 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0196-06

基因沉默,即原先基因的表达受到抑制。根据其机理的不同,基因沉默可分为 2 类:一是转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS),二是转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[1-3]。TGS 发生在 DNA 的水平上,与目的基因启动子区域的甲基化有关;PTGS 发生在 RNA 的水平上,由目的基因的 mRNA 特异降解所引起的沉默。病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是一种转录后水平的基因沉默(PTGS),其由于外源基因的导入,导致植物中与该外源基因一致或高度同源的植物内源 mRNA 序列的特异性降解^[4-6]。近几年,随着植物基因组序列或基因组表达标签(expressed sequence tags, EST)的大量测定,VIGS 已被开发成为一项快速高通量基因功能鉴定新技术,在植物功能基因组学的研究中得到越来越广泛的应用。

1 病毒诱导基因沉默(VIGS)

1.1 VIGS 的建立与发展

早在 1995 年,KUMAGAI 等^[7]首次在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)上插入一段八氢番茄红素脱氢酶(PDS)cDNA 片段,构建 TMV-PDS 病毒载体,

侵染植物后,由于植物自身 PDS mRNA 转录水平的显著降低而表现出叶片失绿变白现象。1999 年,BAUL-COMBE^[8]利用 TMV、PVX(potato virus X)病毒携带碎片的 PDS mRNA 介导基因沉默,上部叶病株表现明显的漂白效果,因此,提出 VIGS 能有效的抑制植物内源基因的表达,从而可以利用病毒载体携带未知功能基因进行基因功能鉴定。2001 年,RATCLIFF 等^[4]构建 TRV-PDS 重组载体,同时利用马铃薯 X 病毒(PVX)携带荧光蛋白序列(GFP)分别侵染植株,结果含 PDS 的重组载体侵染植株叶片后出现的白化现象比 PVX 沉默的水平更高。因此,提出 TRV 载体诱导基因沉默的效率和持久性均优于 PVX 载体。

DNA 病毒载体侵染植物同样可以得到探索基因功能的应用。FOFANA 等^[8]构建非洲木薯花叶病毒(african cassava mosaic virus, ACMV)的基因沉默载体作为反向遗传学工具,验证分析木薯基因功能;LU 等^[9]构建建兰花叶病毒(cymbidium mosaic virus, CymMV)的基因病毒载体,应用 VIGS 技术验证兰科植物基因的功能。随着 RNA 病毒载体与 DNA 病毒载体在 VIGS 体系的发展,GOSSELE 等^[10]提出了一种基于卫星病毒的 VIGS 体系—TMV U2 的卫星病毒(satellite tobacco mosaic virus, STMV),并对其基因组进行了改造,通过在烟草上对 PDS 等 13 个植物内源基因的测试表明,STMV 载体能够有效地抑制这些基因的表达并呈现明显的表型突变。

此外,随着 VIGS 技术的日趋发展与成熟,除本氏烟外,还在多种模式植物,重要经济作物,观赏植物上逐步建立起 VIGS 体系,如在拟南芥^[11]、番茄^[12]、马铃

第一作者简介:陈峥(1991-),女,硕士研究生,研究方向为观赏植物的应用与设计。E-mail:392236257@qq.com.

责任作者:何少云(1957-),男,博士,副教授,现主要从事观赏植物应用与设计等教学与研究工作。E-mail:syhe2001@163.com.

基金项目:广东省科技厅星火计划资助项目(2012A020602101);广东省科技计划资助项目(2013B020302006)。

收稿日期:2016-02-14

薯^[13]、非洲木薯等植物上构建 VIGS 体系并成功应用。

1.2 VIGS 的技术原理

基因沉默的关键分子是小 RNA 分子,可根据其来源及产生的不同分为小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、miRNA (micro RNA) 以及 piRNA (piwi-interacting RNA)^[14]。双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 经 RNase III 类的 Dicer 切割后形成大小约为 21~25 nt 的 siRNA 和 miRNA。siRNA 能够与 RNase 结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC), 这一 RISC 复合体能够特异的降解同源 mRNA^[15]。基因沉默最终由于目的基因 mRNA 的降解, 导致该目的基因 mRNA 无法再行使使功能继续传递该基因的遗传信息^[16], 使被侵染的植株表现出目的基因突变的性状或不表达, 从而推断目的基因的功能或提供生物学依据。

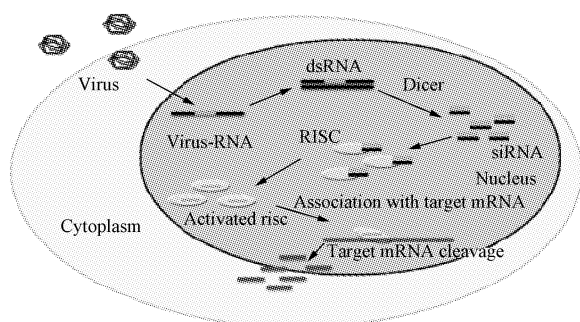


图 1 VIGS 原理图^[16]

Fig. 1 VIGS principle^[16]

2 VIGS 载体在观赏植物中的应用

2.1 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。VIGS 病毒载体可分为 3 类, 即 RNA 病毒载体、DNA 病毒载体、卫星病毒载体。

2.1.1 RNA 病毒载体 VIGS 采用的病毒载体大多为 RNA 病毒载体, 如烟草花叶病毒 (TMV)、烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV)、马铃薯 X 病毒 (PVX)、竹花叶病毒 (bamboo mosaic virus, BaMV)^[17]、大麦条纹花叶病毒 (barley stripe mosaic virus, BSMV)、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)、番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus, TBSV)、菜豆荚斑病毒 (bean pod mottle virus, BPMV)^[18]、柑橘碎叶病毒 (citrus tatter leaf virus, CTLV)^[19]、柑橘叶斑病毒 (citrus leaf blotch virus, CLB)^[20] 和苹果潜隐球形病毒 (apple latent spherical virus, ALSV)^[21] 等逾 10 种病毒载体。其中 TMV 病毒是最早被应用于 VIGS 技术中, 但 TMV 病毒与 PVX 病毒具有侵染植株后导致病毒症状较重、基因沉默效率不高、效果不长久的特点^[13]。因此, LACOMME 等^[22] 于

2003 年提出通过将目的片段以倒位重复的方式插入 TMV 载体中, 可提高 VIGS 的效率。

2.1.2 DNA 病毒载体 DNA 病毒载体主要有番茄金色花叶病毒 (tomato golden mosaic virus, TGMV)、甘蓝曲叶病毒 (cabbage leaf curl virus, CaLCuV)、建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, CymMV)^[9] 和非洲木薯花叶病毒 (African cassava mosaic virus, ACMV)^[8, 23-24], 现已较为广泛的应用于本氏烟、拟南芥、木薯、兰科植物等植物上进行基因沉默的研究。

2.1.3 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^[25]。如由中国番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV) 经 DNA β 分子改造得到的一种新型的基因诱导沉默的载体^[26]。虽有很多病毒载体在 VIGS 上成功应用, 但因病毒载体的不同, 其在不同宿主植株上表现出的系统沉默效应也有所不同。因此, 要考虑其寄主范围, 选择对试验的植物有良好侵染性、不产生病害表型并能在寄主植物中表现出良好沉默效应的病毒载体。

2.2 病毒载体在观赏植物中的应用

目前在观赏植物中成功应用的 VIGS 载体有 2 个, 即烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 和建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, CymMV)。

TRV 病毒载体因其具有沉默效应高, 效果持久, 并且于植物各组织上侵染均有效果而被广泛应用于本氏烟、番茄、马铃薯、辣椒等多种茄科植物及拟南芥等十字花科植物上。除去模式植物及粮食作物的 VIGS 载体体系的应用外, TRV 载体还被成功的应用于观赏植物如加洲罂粟^[27] (*Eschscholzia californica*)、长春花^[28] (*Catharanthus roseus*)、观赏花烟草^[29] (*Nicotiana glauca*)、月季花^[30] (*Rosa hybrida*)、矮牵牛^[25] (*Petunia hybrida*)、唐菖蒲^[31] (*Gladiolus hybridus*)、百合^[32] (*Lilium spp.*)、非洲菊^[33] (*Gerbera hybrida*) 等。TRV 病毒载体现有 pYL256 和 pYL297, 由 RATCLIFF 等^[4] 构建的 TRV RNA1 和 TRV RNA2 经 LIU 等^[34] 改造而得; DONG 等^[35] 改造得到的免连接克隆版本的载体 TRV-LIC; 以及由 VALENTINE 等^[36] 构建的 TRV-2b 的版本。

建兰花叶病毒 (CymMV) 属线形病毒科马铃薯 X 病毒属, 基因组正式单链 RNA (+ssRNA) 约 6.3 kb, 包括 5 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs)^[37]。在 VIGS 载体应用中属于 DNA 病毒载体。通过构建 CymMV 的 VIGS 体系, 应用于兰科植物 (Orchidaceae) 的花色及花形态发育相关的功能基因的探究。

3 VIGS 技术在观赏植物功能基因研究的应用

3.1 抗病相关基因

VIGS 技术应用较为活跃的领域是对植物抗病相关

基因的鉴定,并且主要集中在拟南芥、大麦、本氏烟、马铃薯、番茄等几个植物上^[38]。随着 VIGS 技术发展的日趋成熟,其抗病相关基因的功能探究已慢慢发展至花卉相关抗病基因上。王金刚等^[38]通过对瓜叶菊 *Mlo* 基因构建 VIGS 载体,在白粉菌的诱导处理下得到 *Mlo* 基因表达量下降的现象,表明 *Mlo* 基因参与瓜叶菊白粉病的调控过程。

3.2 抗衰老及代谢相关基因

在植物代谢的调控研究中,VIGS 应用技术发挥了很大的作用,其可克服传统基因敲除技术存在的可能致使植物发生畸形突变或致死突变的情况,而使试验无法正常进行的缺点,具有巨大的潜在利用价值。CHEN 等^[25]和 JIANG 等^[39]通过构建 TRV-CHS/ACO 重组载体,侵染矮牵牛植株,得到 ACC 氧化酶基因编码 ACO4 片段转录水平降低,无论是在 ACC 或授粉的处理下,白色花(沉默的)或者白色花(沉默的)部位产生的乙烯和衰老程度较紫花(非沉默)的组织少。他们同时指出,在含有以 CHS 基因作为靶基因的 VIGS 体系中,可应用于研究花器官衰老相关基因的功能^[40]。HUNTER 等^[41]利用 VIGS 技术以 TRV 作为病毒载体侵染矮牵牛植株,对调控 β -半乳糖苷酶的基因诱导沉默后, β -半乳糖苷酶活性大大降低,矮牵牛植株的衰老速度变慢。JIANG 等^[42]利用 VIGS 技术对月季(*Rosa hybrida* cv. *Samantha*)花瓣侵染诱导沉默调节细胞膨压及外源乙烯、ABA 的相关基因 *RhNAC3*,结果表明在 *RhNAC3* 基因沉默后表达下调,月季花瓣的细胞膨压显著降低并开始重新吸水。

3.3 花形态发育相关基因

VIGS 技术作为快速鉴定植物基因功能的有效方法之一,可应用于观赏植物中探究花形态发育相关基因的功能。HSIEH 等^[43]利用 VIGS 技术,诱导沉默与兰科植物花形态发育有关的 5 个转录因子相关基因;诱导沉默结果表明 *PeMADS7*、*PeHB* 和 *PeZIP* 为兰科植物晚花发育相关基因;*PeMADS1* 和 *PeMADS6* 分别为兰科植物花的唇柱及植物表皮表面细胞的角质层发育相关基因。利用 VIGS 诱导 *NGATHA* 和 *EcNGA* 基因沉默,并用显微技术鉴定其表型变化,结果表明 *NGATHA* 和 *EcNGA* 基因沉默后拟南芥花柱及柱头的发育严重缺陷^[44]。

3.4 花色相关基因

随着观赏植物需求的增长,观赏价值高的花色与花香类植物成为研究的热点。除了利用基因敲除技术探究其调控花色的基因功能外,VIGS 成了目前高效、高通量的基因功能鉴定技术。一些控制花色的相关基因,如蝴蝶兰 *PeUGT3* 是控制花青素合成的一个基因,通过

对该基因的沉默,可使花瓣颜色变淡^[45-46]。DENG 等^[47]通过 TRV 介导沉默控制合成花青素的查尔酮合酶相关基因 *GCHS1* 和非洲菊 B 型 *MADS-box* 基因 *GGLO1*,得到花瓣颜色变浅和花瓣退化成线形的现象;于 2014 年提出在非洲菊花瓣细胞中 *GCHS1* 和 *GCHS4* 的表达高,但只有 *GCHS1* 是促进类黄酮的生物合成^[32]。

4 VIGS 技术在观赏植物中应用效率的影响因素

4.1 VIGS 载体插入的目的片段长度

在 VIGS 载体中插入目的基因片段的序列及大小都影响着 VIGS 沉默的效率。BURCH-SMITH^[11]、LU^[15]认为插入片段的大小在 300~500 bp 为宜;插入的目的片段不超过 1.5 kb^[48]。然而 AGUERO 等^[20]认为插入的片段在 150~500 bp 为宜;而 VOINET 等^[49]与 LIU 等^[50]却认为片段大小在 200~350 bp 最好。但他们共同的观点是:插入片段与目的基因的同源性越高,VIGS 沉默的效果越好。

4.2 寄主植物的生育期

不同植物材料,其适合接种的最佳时期也有所不同。寄主生育期的不同对 VIGS 试验沉默的效果也不同,一般选用植株的幼苗期进行 VIGS 诱导接种,其得到的基因沉默效果显著且具有较高的效率。多篇文献报道提出:观赏烟草最佳 VIGS 接种时期为 5~6 叶期^[28];非洲菊最佳 VIGS 接种时期为小于 4 周大小的幼苗^[47];矮牵牛最佳 VIGS 接种时期为 7~8 叶期^[51]。SUNG 等^[28]利用 VIGS 技术通过侵染植株根、茎、叶、花不同器官部位,其结果表明利用 TRV 病毒介导的基因沉默是在叶片和花的效果显著。选择正确的时期进行病毒侵染可有效提高 VIGS 的基因沉默效果。

4.3 植物的培育条件

VIGS 病毒接种后植物的培育条件直接影响到病毒在植物体内的复制和传播,以及影响植物的生长。因此,VIGS 的基因沉默效率与植物的培育条件息息相关。其中,温度是重要的影响因素。EFTEKHARIYAN 等^[52]提出利用 TRV-*Npds* 的 GV3101 农杆菌液侵染曼陀罗叶,初侵染后于 20℃ 中放置过夜后置于 23~25℃ 的环境下,得到同源基因 RNA 沉默后含量下降 76%。

湿度是影响 VIGS 沉默效率的另一个重要因子。AGUERO 等^[20]试验指出,在 60% 的湿度下培育侵染的烟草植株可得到较好的 VIGS 沉默效果。因此,通过人工温室培养技术可提高 VIGS 的沉默试验效率,保持基因沉默的稳定性及准确性。

4.4 农杆菌浓度(OD 值)

除了环境、植物生育期、诱导沉默接种的目的片段长度等因素除外,影响着基因沉默效率、沉默表型的延

续表达时间和沉默发生的系统性程度还受诱导沉默接种的农杆菌浓度及活性的影响。一般认为在农杆菌活性最高的浓度下进行 VIGS 的沉默诱导接种植物,其得到的沉默效率最高,侵染的效果最好。农杆菌活性最高在于 $OD_{600}=0.5\sim 1.0$ ^[28]。不同的植物、不同的病毒载体,其 VIGS 的诱导沉默接种的农杆菌浓度(OD_{600})也不同。DENG 等^[47]利用 TRV 载体, $OD_{600}=2$ 的农杆菌液利用叶背注射法侵染 3 周的非洲菊幼苗得到较好的沉默表型。所以,对于不同的研究对象,应充分考虑并摸索最适宜的农杆菌侵染液浓度以成功建立高效的 VIGS 体系。

5 讨论与展望

VIGS 作为研究植物基因组功能的技术,具有速度快、高通量、能避免植物的遗传转化、可进行引起致死功能基因突变的研究、能够在不同植物之间快速进行同源基因的功能比较、也可在不同植物中研究同一基因的功能作用以提高基因功能验证的准确性等优点^[53-54]。

同时,VIGS 技术存在的缺点仍不能忽视。VIGS 技术作用于植物上,主要表现为交叉保护现象,这使得 VIGS 体系即使系统性的发生,但未能使基因沉默的表现遍及整个植株;其次,寄主范围的局限性使得在构建 VIGS 体系时应选择适宜寄主植物的病毒载体。因 VIGS 表型会随环境及植株生长情况而变化,VIGS 的沉默效应也存在消失快、表型恢复强的缺点,且不遗传给下一代,致使植物种子或幼苗生长发育相关基因的功能探究存在一定的难度^[55-56]。

VIGS 从提出至今已近 20 年的时间,其作为研究植物基因组功能的高通量生物学技术已成功应用于茄科植物(番茄、马铃薯等)、拟南芥、本氏烟、小麦等植物上。随着 VIGS 技术的发展与成熟,更多 VIGS 病毒载体的优化与发展,VIGS 技术在观赏植物上的应用逐渐深入,其在观赏植物花色、形态发育、衰老机制等相关基因功能的鉴定及观赏植物分子育种上有良好的应用前景。此外,VIGS 技术还可在植物保护途径上开辟新途径,除对植物内源基因的作用外,同样也可对真菌、病毒、线虫等病原基因进行沉默,从而实现对线虫、真菌等病害防控^[57-59]。PANWAR 等^[60]指出,VIGS 载体侵染植株,能有效沉默小麦条锈病致病基因的表达,从而降低病害程度。然而,利用 VIGS 技术在观赏植物的真菌、病毒、线虫等病害的防治应用较少。因此,VIGS 技术在观赏植物保护途径的开发、分子育种的相关观赏性状基因功能的鉴定有更广阔的应用前景。

参考文献

[1] MARTIENSSEN R. Epigenetic phenomena: paramutation and gene silencing in plants[J]. *Current Biology*, 1996, 6(7): 810.

- [2] MATZKE M A, MATZKE A J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us[J]. *Trends Genet*, 1995, 11(1): 1-3.
- [3] HAMILTON A J. A Species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.
- [4] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2001, 25(2): 237-245.
- [5] 王宏芝, 李瑞芬, 王国英, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组学研究中的应用[J]. *自然科学进展*, 2005, 15(1): 8-14.
- [6] BAULCOMBE D C. Fast forward genetics based on virus-induced David C Baulcombe[J]. *Plant Biology*, 1999(2): 109-113.
- [7] KUMAGAI M H, DONSON J, DELLA-CIOPPA G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995, 92(5): 1679-1683.
- [8] FOFANA I B, SANGARE A, COLLIER R, et al. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(4): 613-624.
- [9] LU H C, CHEN H H, TSAI W C, et al. Strategies for functional validation of genes involved in reproductive stages of orchids[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 558-569.
- [10] GOSSELE V, FACHE I, MEULEWAETER F, et al. SVEISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants[J]. *Plant Journal*, 2002, 32(5): 859-866.
- [11] BURCH-SMITH T M. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(1): 21-27.
- [12] LIU Y, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2002, 31(6): 777-786.
- [13] FAIVRE-RAMPANT O. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1308-1316.
- [14] 蒋琳, 魏春红, 李毅. 病毒基因沉默抑制子及其作用机制[J]. *中国科学(生命科学)*, 2012(1): 16-28.
- [15] LU R. Virus-induced gene silencing in plants[J]. *Methods*, 2003, 30(4): 296-303.
- [16] 姚丹青, 张微微, 原丽华, 等. VIGS 植物功能基因组学研究的革命[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(1): 155-161.
- [17] 林文武, 杨文婷, 张洁, 等. 竹花叶病毒的研究进展及其作为表达载体的应用[J]. *武夷科学*, 2014(1): 175-186.
- [18] ZHANG C, GHABRIAL S A. Development of bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean[J]. *Virology*, 2006, 344(2): 401-411.
- [19] 宋震. 柑橘碎叶病毒侵染性克隆构建及其诱导的基因沉默(VIGS)体系建立[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [20] AGUERO J, VIVES M D C, VELAZQUEZ 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.
- [21] KON T, YOSHIKAWA N. Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing[M]. *Frontiers: Microbiology*, 2014.
- [22] LACOMME C, HRUBIKOVA K, HEIN I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats[J].

The Plant journal; for cell and molecular biology, 2003, 34(4): 543-553.

- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] CHEN J C, JIANG C Z, GOOKIN T E, et al. Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(4): 521-530.
- [26] TAO X R, ZHOU X P. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants[J]. Plant Journal, 2004, 38: 850-860.
- [27] WEGE S, SCHOLZ A, GLEISSBERG S, et al. Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California poppy (*Eschscholzia californica*): An evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants[J]. Annals of Botany, 2007, 100(3): 641-649.
- [28] SUNG Y C, LIN C L, CHEN J C. Optimization of virus-induced gene silencing in *Catharanthus roseus*[J]. Plant Pathology, 2015, 63(5): 1159-1167.
- [29] 张茜. 观赏花烟草 (*Nicotiana glauca*) VIGS 体系构建与优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [30] 范天刚. 月季花器官发育基因 AGAMOUS 对低温导致花朵过度重瓣化的作用研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [31] ZHONG X, YUAN X, WU Z, et al. Virus-induced gene silencing for comparative functional studies in *Gladiolus hybridus*[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(2): 301-312.
- [32] 化占勇. 百合查尔酮合酶(CHS)基因对花色调控影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [33] DENG X, BASHANDY H, AINASOJA M, et al. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*[J]. New Phytologist, 2014, 201(4): 1469-1483.
- [34] LIU Y, SCHIFF M, MARATHE R, et al. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus[J]. Plant Journal, 2002, 30(4): 415-429.
- [35] DONG Y, BURCH-SMITH T M, LIU Y, et al. A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for NbMADS4-1 and -2 in floral development[J]. Plant Physiology, 2007, 145(4): 1161-1170.
- [36] VALENTINE T, SHAW J, BLOK V C, et al. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector[J]. Plant Physiology, 2004, 136: 3999-4009.
- [37] WONG S M, MAHTANI P H, LEE K C, et al. *Cymbidium* mosaic pot-exvirus RNA complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis[J]. Arch Virology, 1997, 142: 383-391.
- [38] 王金刚, 吕远达, 李声影, 等. 瓜叶菊 *Mlo* 基因的克隆、分析及 VIGS 载体构建[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(5): 26-30.
- [39] JIANG C, CHEN J, REID M, et al. Functional analysis of genes associated with flower senescence[Z]. Italy: Verona, 2005.
- [40] CHEN J, JOHNSON F, CLARK D, et al. Potential application of virus-induced gene silencing (VIGS) in flower senescence studies[Z]. Netherlands: Wageningen Univ & Res Ctr, Doorwerth, 2005.
- [41] HUNTER D A, JIANG C Z, LABAVITCH J M, et al. A viral induced gene silencing approach to study galactose loss in cell walls during flower development and senescence[Z]. New Zealand: Napier, 2010.
- [42] JIANG X J, ZHANG C Z, LU P L, et al. *RhNAC3*, a stress-associated NAC transcription factor, has a role in dehydration tolerance through regula-

ting osmotic stress-related genes in rose petals[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 12(1): 38-48.

- [43] HSIEH M, PAN Z, LAI P, 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.
- [44] FOURQUIN C, FERRANDIZ C. The essential role of *NGATHA* genes in style and stigma specification is widely conserved across eudicots[J]. New Phytol, 2014, 202(3): 1001-1013.
- [45] 李崇晖, 仇键, 杨光穗, 等. 兰花花色化学及相关功能基因研究进展[J]. 热带农业科学, 2013, 33(7): 45-53.
- [46] HSIEH M, LU H, PAN Z, et al. Optimizing virus-induced gene silencing efficiency with *Cymbidium* mosaic virus in *Phalaenopsis* flower[J]. Plant Science, 2013, 201-202: 25-41.
- [47] DENG X, 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.
- [48] 杨迎伍, 李正国, 宋红丽, 等. VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 379-383.
- [49] VOINET O, LEDERER C, BAULCOMBE D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*[J]. Cell, 2000, 103(1): 157-167.
- [50] LIU Y, NAKAYAMA N, SCHIFF M, et al. Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(5): 701-711.
- [51] 陶小荣, 钱亚娟, 周雪平. 卫星 DNA 沉默载体的改良及其改变矮牵牛叶色和花色的研究[J]. 科学通报, 2006, 51(17): 2041-2044.
- [52] EFTEKHARIYAN G M R, KARIMI F, MOUSAVI G S L, et al. Assessing the tobacco-rattle-virus-based vectors system as an efficient gene silencing technique in *Datura stramonium* (Solanaceae)[J]. Virus Genes, 2014, 49(3): 512-516.
- [53] 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): 3-15.
- [54] 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]. The Plant Journal, 2004, 39(5): 734-746.
- [55] BRIGNETI G, MARTIN-HERNANDEZ A M, JIN H, et al. Virus-induced gene silencing in[J]. The Plant Journal, 2004, 39(2): 264-272.
- [56] 程维舜, 徐秋芳, 黎飞, 等. 适于烟草脆裂病毒诱导的本氏烟基因沉默分析的对照载体构建(英文)[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2012, 28(1): 10-20.
- [57] 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.
- [58] KURTH E G, PEREMYSLOV V V, PROKHNEVSKY A I, et al. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine[J]. Journal of Virology, 2012, 86(11): 6002-6009.
- [59] NUNES C C, DEAN R A. Host-induced gene silencing: A tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(5): 519-529.
- [60] PANWAR V, MCCALLUM B, BAKKEREN G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the barley stripe mosaic virus[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 81(6): 595-608.

胡萝卜遗传转化研究进展

张琳, 李翔宇, 林彦萍, 王康宇, 王义, 张美萍

(吉林农业大学 人参基因资源工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要:综述了胡萝卜遗传转化的研究进展,主要介绍了农杆菌介导法和 DNA 直接转化方法(包括基因枪法、电击法和 PEG 介导法)的分子机制和进展,并对遗传转化中受体基因型、外植体类型和菌株类型等影响因素进行阐述,以期建立一个高效胡萝卜遗传转化体系提供理论依据。

关键词:胡萝卜;遗传转化;转化方法;影响因素

中图分类号:S 631.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0201-04

胡萝卜(*Daucus carota*)属伞形科萝卜属二年生草本植物,是全球性十大蔬菜作物之一,是人类饮食中维生素 A 的主要来源。其肉质根富含维生素 A 和植物纤维,具有益肝明目、清热解毒、利膈宽肠、降糖降脂等功效。

胡萝卜是植物组织培养中的模式植物之一,有良好的组织培养和遗传转化基础,具有潜在的器官发生和体细胞胚胎发生的特点,使其更适合作为模式植物用于研究植物形态发生、体细胞胚胎发生、体细胞无性系变异

及原生质体复苏的生物学过程。20 世纪 80 年代以来,转基因技术用于研究胡萝卜基因组功能和调控、植物代谢及农艺性状和品质等。但由于胡萝卜组织培养和遗传转化效率受诸多因素影响,如受体基因型、外植体类型、转化菌株类型和转化后培养基的选择、预培养时间(温度)、共培养时间(温度)、抗生素浓度筛选等,所以建立一个高效再生遗传转化体系十分重要。现对胡萝卜遗传转化方法的分子机制和进展以及影响转化的因素进行了综述,以期以胡萝卜为受体的基因改造提供理论依据。

1 不同遗传转化方法的研究

植物遗传转化是利用基因工程手段将外源基因导入受体植物基因组中,并在后代中表达的过程。该技术实现了特定基因在不同种属间的转化,打破了传统常规育种的界限,加快了育种进程,为种质资源创新及育种提供理论基础和技术手段^[1]。近年来,大部分遗传转化

第一作者简介:张琳(1990-),女,硕士研究生,研究方向为功能基因组学。E-mail:1181351498@qq.com.

责任作者:张美萍(1964-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事系统基因组学研究与应用等研究工作。E-mail:mpzhang@tam.u.edu.

基金项目:中国科学技术部 863 计划资助项目(2013AA102604-3)。

收稿日期:2016-03-07

Advance in Applications of Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Technology to Ornamental Plants

CHEN Zheng, XIN Liqin, WU Chaoqun, WANG Qingqing, HE Shaoyun

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) technology is widely used in identifying the functions of genes related to plant growth and development, resistance, metabolism and so on. VIGS technology has many merits, such as short period, low cost, no need for genetic transformation, high throughput. Ornamental plants have higher economical values, and it is expected VIGS technology can be widely used in them. This paper reviewed the mechanism, establishment and development of VIGS technology, factors affecting the efficiency of VIGS technology in ornamental plants, and applications of VIGS technology to ornamental plants. In addition, the prospects of VIGS technology in the applications to conservation and molecular breeding in ornamental plants were also discussed.

Keywords: virus-induced gene silencing(VIGS); ornamental plants; gene function; virus vector