

刘 军, 杨 艳, 周晓慧, 等. 应用于茄子的病毒诱导的基因沉默体系的建立与优化[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 880-886.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.024

应用于茄子的病毒诱导的基因沉默体系的建立与优化

刘 军, 杨 艳, 周晓慧, 姜悬云, 鲍生有, 庄 勇

(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 本研究以八氢番茄红素脱氢酶(*PDS*)基因作为指示基因, 探讨不同接种方式、培养环境、菌液数量浓度和接种时间对烟草脆裂病毒(TRV)诱导茄子植物内源*PDS* mRNA 沉默效率的影响, 进而测试该沉默体系在不同基因型茄子上的沉默效率。结果表明, 在昼夜温度 25 °C/20 °C, 16 h 光周期条件下, -25 kPa 压强下真空抽气 2 min 渗透侵染露白后 2~3 d 的种子能够获得最佳沉默效率; 与传统注射压迫法相比真空渗透萌芽种子能够更快、更明显出现沉默表型, 缩短试验周期, 且该方法在不同基因型茄子中都获得较高沉默效率, 说明基于真空侵染萌芽种子法的 VIGS 体系可应用于茄子基因功能研究。

关键词: 茄子; VIGS; 真空侵染; 萌芽期种子

中图分类号: S641.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0880-07

Establishment and optimization of virus-induced gene silencing in eggplants

LIU Jun, YANG Yan, ZHOU Xiao-hui, JIANG Xuan-yun, BAO Sheng-you, ZHUANG Yong

(*Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory of Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China*)

Abstract: In this study, phytoene desaturase (*PDS*) was used as an indicator to explore effects of different inoculation methods, temperatures, microbial concentrations, inoculation time on silencing efficiency of eggplant endogenous *PDS* mRNA induced by tobacco rattle virus (TRV). Moreover, silencing efficiency of *PDS* in eggplants with different phenotypes was tested. The results showed that higher silencing efficiency was induced under the conditions of -25 kPa vacuum infiltration for two minutes, the seeds germinated for two to three days, and plant growth temperature at 25 °C day and 20 °C night. Compared to other techniques such as leaf infiltration, the new inoculation method could obtain phenotype earlier and more obviously and shorten assay period. In addition, the phytoene desaturase gene in different genotypes of eggplants were successfully silenced using the optimized virus-induced gene silencing (VIGS) system, indicating that the VIGS system based on vacuum infiltration of germinated seeds could be used for investigation of gene function in eggplants.

Key words: eggplant; virus-induced gene silencing (VIGS); vacuum-infiltration; germinated seeds

收稿日期: 2017-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672145); 国家自然科学基金青年基金项目(31701932); 江苏省重点研发计划项目(BE2016329)

作者简介: 刘 军(1985-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事茄子遗传育种研究。(E-mail) kehl_lau@foxmail.com

通讯作者: 庄 勇, (E-mail) jaaszy@163.com

病毒诱导的基因沉默技术(Virus-induced gene silencing, VIGS)是通过一段携带靶基因序列的重组病毒载体侵染植株, 植株出现目标基因功能丧失或者表达水平降低等现象, 进而分析基因功能的方法^[1-2]。与其他基因功能验证的方法相比较, 该方法不需要遗传转化, 鉴定速度快, 周期短, 可在不同遗传背景以及不同物种间进行基因功能的研究, 为寻

找植物新基因以及研究基因功能开辟了一条快捷高效的途径^[3-4]。近十年来,已有 30 多种病毒载体被先后报道,如 TMV、TRV、PVX、BPMV、BSMV、CMV 等^[5-6]。其中 TRV 应用最为广泛,成为研究植物功能基因组的常规工具,特别是在茄科作物功能基因研究中,目前利用该技术已在番茄中成功鉴定或验证了大量功能基因^[7]。

茄子是中国重要的蔬菜作物,近几年其生物育种技术研究取得较快进展^[8],特别是随着现代分子生物学与测序技术的发展和变革,越来越多的茄子基因和核酸序列被报道,大量未知基因有待发掘与鉴定^[9]。VIGS 技术作为一种能够快速解析植物基因功能的方法已经成功运用在茄子部分功能基因研究中^[10-13],但在茄子 VIGS 研究中多采用注射压迫法进行接种菌液,存在沉默效率低,沉默体系不健全,试验周期长,严重制约了茄子 VIGS 技术的应用与发展。本研究利用八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*)作为报告基因,利用本实验室已构建好的 pTRV2-*smPDS* 沉默载体,以不同类型茄子为材料,对茄子 VIGS 基因沉默体系进行探索和优化,旨在建立一套高效的茄子 VIGS 体系,为下一步茄子功能基因组学研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验所用到的茄子材料由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。含有病毒载体 pTRV1、pTRV2、pTRV2-*smPDS* 质粒的农杆菌 GV3101 由江苏省农业科学院高效园艺作物遗传改良实验室保存。

1.2 农杆菌准备与侵染

分别将含有 pTRV2-*SmPDS*、pTRV1、pTRV2 质粒的农杆菌 GV3101 划线活化,挑取单克隆到 2 ml YEB 的液体培养基(含 50 mg/L 庆大霉素、50 mg/L 卡纳霉素和 25 mg/L 利福平)中,28 ℃,200 r/min 摇菌过夜。通过 PCR 鉴定将含有目的质粒菌液按照体积比 1:50 加入到 YEB 液体培养基(含 10 mmol/L MES、20 μmol/L 乙酰丁香酮、50 mg/L 庆大霉素、50 mg/L 卡纳霉素和 25 mg/L 利福平)中,28 ℃ 摇菌过夜到 OD_{600} 值为 1.0~2.0,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 MMA 缓冲液(10 mmol/L $MgCl_2$ 、200 mmol/L 乙酰丁香酮、10 mmol/L MES)悬浮,调节悬浮液 OD_{600} 值在 0.5~1.5,促使 3 个悬浮液

间 OD_{600} 值越接近越好,再将 pTRV1 与 pTRV2-*smPDS*、pTRV2 菌液等体积混合,室温暗处放置 3 h 准备接种,分别按照以下几种方式接种,以 pTRV2 为对照,处理材料为茄子品种苏州牛角。

真空侵染:参照 Yan 等^[14]的方法,将发芽种子 30 粒,放入含有 5 ml pTRV1:pTRV2-*smPDS* 混合菌液的 10 ml 离心管中,打开离心管盖后放入真空侵染系统(由真空干燥器和便携式真空泵组成)后抽真空。侵染完成后,取出种子播种在 50 孔穴盘中,20 ℃ 培养箱中暗培养到出苗后转入正常光照培养。

注射压迫法:利用 2 ml 无针头注射器向茄子叶背面压迫注射菌液,使菌液充满整个叶片。

根吸收法:将出苗后 10 d 子叶平展的茄子材料从穴盘中取出,用清水洗净根部后放入配置好的侵染液中充分吸收,放置 24 h 后移栽到营养钵中^[15]。

1.3 试验设计

1.3.1 不同接种方式与接种时间 不同菌液侵染接种法参照方法 1.2 的方法进行。其中真空侵染萌芽期种子分别选取露白,露白后 2~3 d(芽长 0.5~1.0 cm)和露白后 4~5 d(芽长 1.0 cm 以上)3 个时期的种子进行侵染(图 1)。注射压迫接种叶片分别选取在茄子出苗后 10 d、20 d、30 d 进行病毒接种,10 d 的幼苗注射子叶,20 d 和 30 d 幼苗分别注射 2 片新叶^[10]。



1:露白;2,3:露白后 2~3 d;4,5:露白后 4~5 d。

图 1 不同发芽阶段种子

Fig.1 The seeds in different germination stages

1.3.2 侵染后植株培养条件 利用真空侵染法,将侵染后的种子播种后放入 20 ℃ 培养箱中暗培养,待出苗后分别转入昼夜温度 20 ℃/16 ℃,25 ℃/20 ℃ 30 ℃/25 ℃,16 h(光)/8 h(暗)光周期,相对湿度 60%的培养箱和自然环境下(培养期间温度在 25~32 ℃)继续培养,观察各处理植株表型变化。

1.3.3 菌液浓度 利用真空侵染种子的方法处理萌芽期种子,分别设置混合前菌液数量浓度 OD_{600} 值为 0.5、1.0、1.5 3 个梯度,研究侵染菌液数量浓度对茄子 VIGS 沉默效率的影响。

1.3.4 渗透压强和渗透时间 为研究真空渗透的渗透压强和渗透时间对茄子 VIGS 沉默效率的影响,分别设置 -18 kPa、-25 kPa 和 -50 kPa 3 个水平,抽气时间设置为 30 s、2 min、5 min 3 个水平,共 9 个组合,每个处理各 30 粒种子。菌液数量浓度 OD_{600} 值为 1.0。

1.3.5 不同基因型茄子比较 采用种子萌发期真空侵染的方法处理苏州牛角、芜湖白茄、西安绿茄和杭州红茄。具体操作方法及接种后管理按照方法 1.2 进行,在种子露白后 2~3 d 进行侵染,菌液数量浓度 OD_{600} 值为 1.0, -25 kPa 抽气 2 min。

1.4 沉默效率的检测

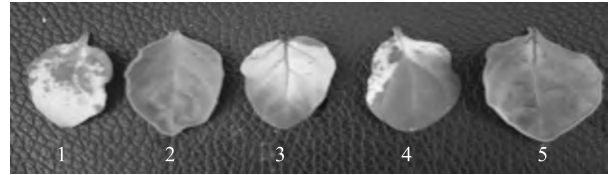
接种病毒后 20 d,观察各处理茄子幼苗叶片的白化情况。分别取不同处理的对照组(pTRV2)和沉默组(pTRV2-*SmPDS*)茄子幼苗的第 2 片真叶,提取总 RNA,反转录合成 cDNA,根据茄子 *PDS* 基因设计引物,以 *Actin* 基因为内参,引物序列分别为 *Actin*-F: 5'-GCAGCTCCTCCATCGAAAAG-3', *Actin*-R: 5'-CCGATCAGCAATACCAGGG-3'; *SmPDS*-F: 5'-GGAGAATTCA GCCGCTTTGA-3', *SmPDS*-R: 5'-TCATCAGTCACCCTA TCCGG-3'。利用 qRT-PCR 检测 *PDS* 沉默效率。

2 结果与分析

2.1 不同菌液接种方式及接种时间比较

种子真空侵染、注射接种都能出现叶片白化现象(图 2),其中种子真空侵染出现白化时间最早,部分幼苗在子叶期就出现白化现象,大部分在接种 10 d 后生长点就出现白化,白化现象可持续 2 个月之久;而 10 d 苗龄和 20 d 苗龄注射接种的幼苗被侵染后在 15~20 d 才逐渐出现白化,在 30 d 左右才能明显看到白化植株,其整体白化程度相对于种子侵染要低。30 d 苗龄注射接种的幼苗大部分植株只表现出新叶变黄,与对照无明显差异,只有少数几株出现白化现象,但白化效果不明显,沉默效率较差。根吸收处理未观察到叶片光漂白现象,未能达到预期效果,证明根吸收法并不适用于茄子的 VIGS 试验。通过 qRT-PCR 检测各处理基因表达量,真空侵染种子和叶面注射处理 *PDS* 基因表达量相对于对照显

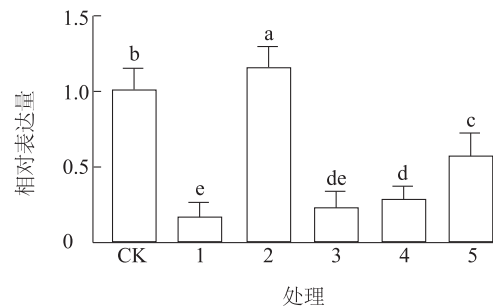
著下降,但真空渗透法表达量最低,仅为对照的 16.8%,沉默效率更加明显,而根吸收处理无明显变化(图 3)。因此真空侵染萌芽种子可做为茄子 VIGS 试验的最佳接种方式。



1:种子真空侵染;2:根吸收法;3:10 d 苗龄注射接种;4:20 d 苗龄注射接种;5:30 d 苗龄注射接种。

图 2 不同侵染方式和接种时间处理后 20 d 植株第 2 片真叶沉默效率比较

Fig.2 Comparison of silencing efficiency of the second true leaf treated with different infection methods and inoculation time for 20 days



CK;pTRV2;1:种子真空侵染;2:根吸收法;3:10 d 苗龄注射接种;4:20 d 苗龄注射接种;5:30 d 苗龄注射接种。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 3 不同侵染方法 *SmPDS* 基因相对表达量

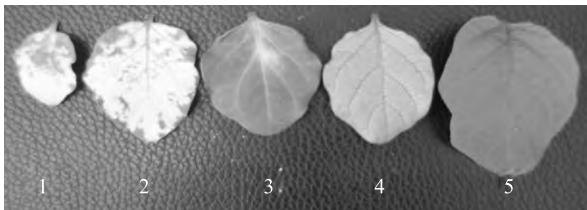
Fig.3 Relative expression of *SmPDS* in different infection methods

真空渗透处理不同发芽期的种子,结果表明,3 个阶段都存在一定的死亡率,其中露白后 4~5 d 侵染的死亡率最高,只有 26.7%的种子能够出苗;在露白后 2~3 d 侵染的种子,有 75%能够出苗正常生长,81.4%的植株出现白化;而露白期侵染的种子出苗率达到 90.0%以上,但是只有 2 株出现白化,沉默效率低。这可能是由于种子刚露白,菌液对芽点伤害较低,所以出苗率高,露白 4 d 以上,芽已完全伸长,菌液侵染后对其伤害较大,导致其出苗率低,而存活的幼苗中获得沉默植株的概率较大,沉默效率高。达到白化表型稳定期后,露白后 2~3 d 侵染与露白

后4~5 d 侵染的沉默植株在表型上并无太大差异。因此,综合分析后认为开展茄子 VIGS 试验时选择在种子露白后2~3 d 进行菌液侵染能够获得最佳的沉默效率。

2.2 不同培养温度对茄子 VIGS 沉默效率的影响

在 20 °C/16 °C 条件下,沉默植株从第一片真叶就出现明显的白化现象,但其生长受到显著抑制,表现为长势慢,叶片小等特征;在 25 °C/20 °C 条件下,植株出现白化表型相对于 20 °C/16 °C 平均要晚2~3 d 左右,但在整体白化率以及白化程度两者无明显差异,而该环境下植株生长却不受抑制;30 °C/25 °C 条件下大部分幼苗只出现花斑叶或者黄叶,只有 5 株在接种 20 d 后逐渐出现白化表型,但白化现象持续21~28 d 后逐渐消失,新叶也未再出现白化(图 4);自然环境下只有 1 株出现白化表型,其余植株都无明显表型变化。部分研究发现 VIGS 试验也可在适宜的自然环境下获得明显的表型变化^[10,16],这可能是由于本试验初期自然环境下气温较高,影响了病毒的复制与表达,所以并未出现明显的白化表型。因此,为能获得理想的沉默效率和较快的植株生长速度,本研究的后续试验都选择在接种后 20 °C 暗培养后转入 25 °C/20 °C 条件下进行。



1:20 °C/16 °C;2:25 °C/20 °C;3:30 °C/25 °C;4~5:自然环境。

图 4 不同环境下侵染 20 d 后植株第 2 片真叶沉默表型比较

Fig.4 Comparison of phenotypes of the second true leaf infected for 20 days under different conditions

2.3 菌液数量浓度对茄子 VIGS 沉默效率的影响

通过比较各数量浓度下种子出苗率发现,在 OD_{600} 值为 1.5 时的种子存活率最低,而 OD_{600} 值为 1.0 和 0.5 的处理均能获得较好的出苗率(>75%) (表 1)。而 OD_{600} 值为 1.5 处理水平下存活幼苗的白化率为 84.62%,1.0 处理水平下为 78.26%,0.5 处理水平下最低,为 61.50%。接种 4 周后茄子幼苗白化程度趋于稳定,通过比较植株表型以及 qRT-PCR 结果显示各处理没有出现沉默效率上的显著

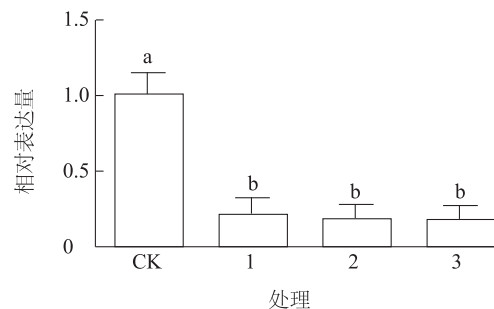
差异,均能达到良好的沉默效果(图 5)。说明菌液数量浓度对茄子 VIGS 沉默效率影响不大,只是对种子存活率有一定影响,可选择 OD_{600} 值 1.0 时作为开展茄子 VIGS 试验最适菌液数量浓度。

表 1 不同菌液数量浓度对茄子 VIGS 沉默效率影响

Table 1 Effect of different microbial concentration on silencing efficiency by virus-induced gene silencing (VIGS)

菌液数量浓度 (OD_{600})	出苗率 (%)	白化率 (%)
0.5	86.67a	61.50b
1.0	76.67b	78.26a
1.5	43.33c	84.62a

同一列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。



CK:pTRV2;1: OD_{600} = 0.5;2: OD_{600} = 1.0;3: OD_{600} = 1.5。不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

图 5 不同菌液数量浓度处理后 *SmPDS* mRNA 的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *SmPDS* mRNA treated with different microbial concentrations

2.4 渗透压强与渗透时间对于茄子 VIGS 沉默效率的影响

通过表 2 对比发现,真空渗透对于种子出苗率有影响,出苗率最高的是-18 kPa+30 s 处理,而最低的是-50 kPa+5 min 处理。接种后总体呈现随着渗透压的增强与渗透时间的延长,植株的出苗率降低,白化率升高,白化表型出现时间早的趋势(图 6)。根据各个处理白化程度分析发现,在-25 kPa 和-50 kPa 压强下,幼苗出现白化表型早,新生真叶基本都呈现白化,沉默效率高,但是-18 kPa 条件下出现白化的时间较晚,且植株白化不明显。综合比较,虽然在-50 kPa 压强下能够获得较高的沉默表型,但是在这个压强下种子出苗率太低,所以最佳的渗透条件可以选择-25 kPa+2 min 或-25 kPa+5 min。

2.5 不同类型茄子材料沉默效率分析

如图7所示,在农杆菌侵染茄子种子30 d后,芜湖白茄、西安绿茄、苏州牛角、杭州红茄均出现了明显的白化现象,品种间白化程度差异不大;利用qRT-PCR对不同材料的*PDS*沉默水平(图8)分析发现,各个材料的*PDS*基因表达量都有明显的降低,其表达量仅为对照的11.8%~27.7%,说明本研究建立VIGS体系能够稳定应用在不同类型的茄子材料中,同时也验证了同一基因序列在不同材料中功能上的高度保守型^[17],也为后期茄子基因功能验证提供理论支持。

表2 不同压强与渗透时间对VIGS沉默效率影响

Table 2 Effect of pressure and penetration time on silencing efficiency by VIGS

处理	出苗率(%)	白化率(%)
-18 kPa+30 s	90.00a	11.10g
-18 kPa+2 min	80.00bc	33.33ef
-18 kPa+5 min	53.30d	31.25f
-25 kPa+30 s	86.67ab	53.84d
-25 kPa+2 min	80.00bc	75.00c
-25 kPa+5 min	73.30c	83.33b
-50 kPa+30 s	43.33e	38.46e
-50 kPa+2 min	43.33e	76.92bc
-50 kPa+5 min	33.33f	90.00a

同一列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

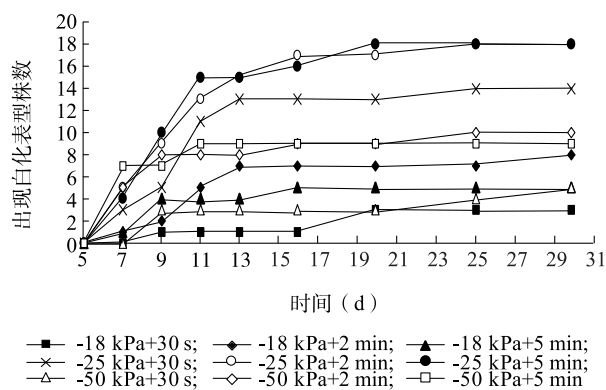
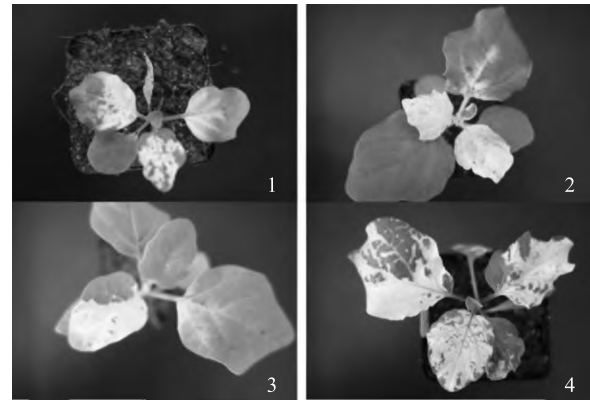


图6 不同压强和渗透时间下出现的白化植株

Fig.6 The albino plant under the conditions of different pressure and infiltration time

3 讨论

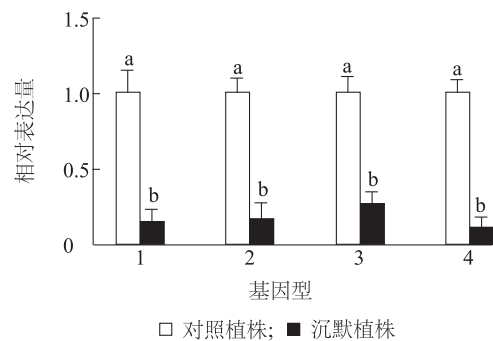
VIGS技术已经广泛应用到番茄、辣椒、烟草等



1: 杭州红茄; 2: 西安绿茄; 3: 芜湖白茄; 4: 苏州牛角。

图7 VIGS载体在不同基因型茄子植物上诱导的*PDS*沉默表型

Fig.7 Phenotype of *PDS* silenced in different eggplant cultivars by the VIGS vector



1: 杭州红茄; 2: 西安绿茄; 3: 芜湖白茄; 4: 苏州牛角。不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

图8 不同基因型沉默植株*PDS*基因的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *SmPDS* in different eggplant cultivars

茄科作物基因功能验证中^[18-19],但是在茄子上应用时间相对较短,虽然VIGS技术在鉴定茄子基因功能方面显示出巨大的潜力,但是茄子VIGS技术仍存在沉默效率不高、持续性差等缺点,本研究通过研究不同接种方法、苗龄大小、环境条件、基因型等对茄子沉默效率的影响,旨在建立一套高效、稳定、快速的茄子基因沉默体系,为茄子功能基因组的研究提供基础。

真空渗透处理是VIGS技术中一种常用的侵染方式,能够获得较高的沉默效率且适合大规模操作。但大多数的真空接种法都是以叶片、果实、花蕾等器官为研究对象,真空渗透处理发芽种子只在番茄、除

虫菊、矮牵牛中有相关报道^[14,20-21]。本研究通过真空渗透法处理茄子萌芽种子,并研究不同菌液数量浓度、接种时间、渗透条件对茄子 VIGS 沉默效率的影响。研究结果显示对不同发芽阶段种子进行处理是茄子 VIGS 真空渗透法中最关键的因素,如果接种处理刚露白种子,虽然存活率高,但沉默效率低,表型不够明显;而接种时间过晚,种子根系过长,吸收菌液较多,从而导致存活率过低,获得沉默植株少,这与 Yan 等^[14]和汤玲^[20]的研究结果相对一致。随着渗透压强的增强与渗透时间的延长,植株的成活率降低,白化率升高,白化表型出现时间早,综合分析在-25 kPa压强下抽气 2~5 min 都能获得稳定的出苗率和较佳的沉默效率;而菌液数量浓度在本研究中并不是茄子真空渗透处理的主要影响因素,对于茄子 VIGS 沉默效率的影响相对较小,穆春等^[22]研究棉花 VIGS 体系优化后也认为菌液数量浓度不是影响 VIGS 沉默效果的关键因素。

真空侵染茄子萌芽种子,能够快速、有效地沉默目的基因,且持续时间长,从而快速实现鉴定基因功能的目的。传统的叶面注射压迫法,通常需要在播种后 14~21 d 进行侵染,至少需要 15 d 左右才能出现表型变化,在 21~28 d 后才有最佳沉默效果^[13]。萌芽期侵染法只需在种子露白后 2~3 d 进行真空侵染,处理后 10 d 即可观察到白化现象,种子处理比叶片注射至少早 14~21 d 观察到表型,而且该方法处理的沉默植株表型变化持续时间长,无明显的表型恢复,解决了注射接种对植株的伤害和部分茄子材料因子叶较小无法进行注射接种等问题,适用范围更广。而本研究中发现通过根吸收法处理植株,没有出现预期的光漂白现象,虽然根吸收法已成功运用到其他作物 VIGS 研究中,但是在茄子中并不适用。因此,利用真空侵染萌芽期种子是茄子 VIGS 试验中一种比较理想的快速、简单、高效的接种方法。

接种后培养环境是影响基因沉默效率的重要因素。温度影响病毒 DNA 的转录复制,在植株体内的传播,沉默信号的产生以及感染症状的严重程度。研究报道较低温度能有利于病毒的复制表达,产生更加明显的基因沉默表型^[23]。但是茄子属于喜温作物,温度过低会抑制植株生长,但是温度过高又会使病毒不表达,因此需要研究茄子基因沉默体系的最佳温度。例如在番茄中的最佳沉默温度为 22 ℃

甚至更低^[1],而在烟草中为 25 ℃^[24],辣椒中为 24 ℃^[25]。本研究通过不同环境下各处理表型变化发现,虽然在 20 ℃/16 ℃条件下,出现表型最早,白化程度最佳,但是植株生长明显受到抑制,而在 25 ℃/20 ℃条件下也能够保证 pTRV 病毒载体在茄子体内较快传播与表达,而且植株生长不受影响,能够获得较高沉默效率。

在茄子遗传转化研究中,不同基因型材料的再生频率存在较大差异,是制约茄子遗传转化体系构建最关键的因素。而 VIGS 技术是否能在不同类型茄子中得到稳定利用,也是开展茄子基因功能及基因组学研究的前提。利用本研究优化的茄子沉默体系,VIGS 技术能够成功应用到不同来源和果色的 4 份材料中,通过表型与 qRT-PCR 试验结果发现各材料间的沉默效率相差不大,基因沉默效率受茄子基因型影响较小。

本研究成功建立了茄子种子萌芽期 VIGS 基因沉默体系。在昼夜温度 25 ℃/20 ℃,16 h 光周期环境下,用 OD_{600} 值 1.0 的菌液数量浓度,在-25 kPa 真空压强下抽气 2 min 的方法侵染露白后 2~3 d 的茄子种子可获得最佳的沉默效率,能够快速、有效地获得目的表型。

参考文献:

- [1] LIU Y L, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato [J]. *Plant Journal*, 2002, 31(6): 777-786.
- [2] 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]. *Plant J*, 2004, 39(5): 734-746.
- [3] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 356.
- [4] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics [J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(12): 656-665.
- [5] 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.
- [6] 向志丹, 张震霄, 李超, 等. 黄瓜花叶病毒基因沉默载体的效率和稳定性分析[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(4): 625-630.
- [7] 杨同文, 武安泉, 盛东峰, 等. 病毒诱导的基因沉默在番茄功能基因组学研究中的应用进展[J]. *园艺学报*, 2014, 41(3): 564-576.
- [8] 连勇, 刘富中, 田时炳, 等. “十二五”我国茄子遗传育种研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2017(2): 14-22.
- [9] HIRAKAWA H, SHIRASAWA K, MIYATAKE K, et al. Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the repre-

- sentative solanum species indigenous to the old world[J]. DNA Research An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes & Genomes, 2014, 21(6):649-60.
- [10] 赵 祯,刘富中,张 映,等. 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.
- [11] 刘 军,周晓慧,冯 翠,等. 利用 VIGS 技术分析野生茄 *Ve* 基因的抗黄萎病功能[J]. 华北农学报, 2014, 29(1):217-221.
- [12] 肖熙鸥,蒋 晶,陈 娜,等. 茄子调控抗青枯病反应信号基因的筛选和鉴定[J]. 园艺学报, 2016, 43(7):1295-1304.
- [13] LIU H, FU D, ZHU B Z, et al. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(6):422-429.
- [14] YAN H, FU D, ZHU B, et al. 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.
- [15] 张召军,王晓彬,王 慧,等. 中国番茄黄化曲叶病毒利用根吸收法诱导基因沉默(VIGS)的初步研究[J]. 生物技术通报, 2014, 34(1):143-146.
- [16] 张 茜. 观赏花烟草(*Nicotiana sanderae*) VIGS 体系构建与优化[D]. 武汉:华中农业大学, 2014.
- [17] 李 媛. 利用根部吸收法进行病毒诱导基因沉默的初步探索[D]. 长春:东北师范大学, 2007.
- [18] 刘廷利,杨玛丽,刘小双,等. 一个受 TYLCV 诱导上调表达的番茄基因 *LeFLS2* 的功能分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2):376-380
- [19] 李然然,王述彬,潘宝贵,等. 辣椒病毒诱导基因沉默接种方法的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14):82-84
- [20] 汤 玲. 除虫菊 *CDS_CCI2* 基因的克隆、功能分析及遗传转化体系建立[D]. 重庆:重庆大学, 2012.
- [21] BRODERICK S R, JONES M L. An Optimized protocol to increase virus-induced gene silencing efficiency and minimize viral symptoms in petunia [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(1):219-233.
- [22] 穆 春,周 琳,李茂营,等. 水培条件下病毒诱导棉花基因沉默体系的建立及优化[J]. 作物学报, 2016, 42(6):844-849.
- [23] GYÖRGY SZITTYA, DÁNIEL SILHAVY, ATTILA MOLNÁR, et al. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation [J]. Embo Journal, 2014, 22(3):633-640.
- [24] NETHRA P, NATARAJA K N, RAMA N, et al. Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector [J]. Current Science, 2006, 90(3):431-435.
- [25] YIN Y X, WANG S B, ZHANG H X, et al. Cloning and expression analysis of *CaPIP1-1*, gene in pepper (*Capsicum annuum*, L.) [J]. Gene, 2015, 563(1):87-93.

(责任编辑:陈海霞)