

蕹菜病毒诱导基因沉默体系构建

张 怡,徐克东,杨 松,李 豪,曹 鹏,魏 森,韦丹丹,李成伟

(周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室 河南 周口 466001)

摘要: 构建蕹菜的病毒诱导基因沉默(Virus induced gene silencing, VIGS)体系,旨在建立蕹菜的快速基因功能验证的方法。通过 RT-PCR 扩增出棉花、大豆、拟南芥的 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(Chloroplasto alterados, CLA)基因片段,并将其分别构建到烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)介导的 VIGS 载体,通过农杆菌 GV3101 侵染蕹菜并观察蕹菜的表型变化。结果显示 3 种不同的 CLA 基因所侵染的蕹菜均出现不同程度的白化现象,半定量 RT-PCR 检测显示 CLA 的 mRNA 被显著降解,表明成功构建了蕹菜的 VIGS 体系。

关键词: 病毒诱导的基因沉默; 蕹菜; CLA 基因; 烟草脆裂病毒

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)06-0065-06

Virus-induced Gene Silencing in *Rorippa indica* Hiern

ZHANG Yi, XU Ke-dong, YANG Song, LI Hao, CAO Peng, WEI Sen, WEI Dan-dan, LI Cheng-wei
(Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding Zhoukou Normal University Zhoukou 466001 China)

Abstract: Virus-induced gene silencing system of *Rorippa indica* Hiern was constructed, which will be used in functional analysis of *R. indica* genes. *Chloroplasto alterados* (CLA) gene fragments of cotton, soybean and *Arabidopsis* were obtained by using RT-PCR. The cloned CLA fragments were constructed into tobacco rattle virus vector (pYY13). The constructed vectors were transformed into *Agrobacterium* strain GV3101, which was used to inoculate *R. indica* plants. All the infected plants showed photobleaching symptom with different degrees. RT-PCR of target genes further confirmed the knock-down of CLA. The established VIGS system will contribute the further study of *R. indica* genes in the future research.

Key words: Virus induced gene silencing; *Rorippa indica* Hiern; CLA gene; Tobacco rattle virus

RNA 沉默是由 RNA 介导的通过核酸序列特异性相互作用抑制同源基因表达的现象,它在真核生物中普遍存在,其中在动物中称为 RNA 干扰(RNAi),真菌中称为消除作用,而在植物中则称为转录后的基因沉默(Post-transcriptional gene silencing, PTGS),包括病毒诱导的基因沉默(Virus induced gene silencing, VIGS),它是一种利用植物病毒载体介导的植物基因沉默方法^[1-2],当携带植物功能基因的病毒侵染植物体后,可诱导植物启动 PTGS 机制防御外来基因的侵入,随着病毒基因组的复制进而沉默掉这些功能基因,从而引起表型或一些生理指标的变化,由此推测该基因的功能。目前,国内外研究者已在茄科^[3-6]、豆科^[7]、十字花科^[8]和禾本科^[9]等植物中建立了病毒诱导的基因沉默体系,并成功应用于基因功能验证的研究工作中。

在植物类胡萝卜素的生物合成过程中,1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 Chloroplasto alterados (CLA) 基因的表达与类胡萝卜素的积累密切相关^[10]。在植物中类胡萝卜素的作用主要是吸收光能和猝灭多余的光能,当植物体内类胡萝卜素表达量下降时,植株将出现白化现象,此表型通过肉眼很容易分辨,所以 γ -脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶基因可以作为检验病毒诱导的基因沉默载体系统是否有效的报告基因。

蕹菜为十字花科一年生或两年生草本植物,具有广泛的药用和食用价值,在全国各地的分布较广。与经典的模式植物—拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)相比,具有较强的环境适应性,易于栽培。虽然拟南芥有其自身的优点,但拟南芥的栽培条件较难控制,对于环境的变化比较敏感,所以在拟南芥的培养过程中需投入大量的人力和物力。蕹菜因其本身的特

收稿日期: 2013-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071807; 31272168)

作者简介: 张 怡(1985-),女,河南汝阳人,实验师,在读硕士,主要从事植物与微生物互作研究。

通讯作者: 李成伟(1972-),男,河南民权人,教授,博士,主要从事植物与病原体互作和抗性分子育种研究。

点故而更有发展成为新型模式植物的潜力。

由于蕹菜的基因组未知,无法设计引物扩增其 *CLA* 基因,因此本试验根据拟南芥的 *CLA* 基因构建 VIGS 体系,同时也尝试构建与蕹菜亲缘关系较远的棉花 (*Gossypium barbadense*, Gb) 和大豆 (*Glycine max*, Gm) 的 *CLA* 基因的重载体,然后分别侵染蕹菜并观察表型变化,探索同源性不同的 *CLA* 基因在同一植物中 VIGS 表型的差异,为 VIGS 体系提供新的寄主植物。

1 材料和方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 DH5 α 为周口师范学院植物遗传与分子育种重点实验室保存, pYY13 质粒由清华大学刘玉乐教授提供。

蕹菜种子由周口师范学院杨同文博士提供。棉花为海岛棉品种、大豆为中黄 13 品种、拟南芥为哥伦比亚野生型品种。

主要试剂: RNA 提取液 (RNAiso Plus)、Taq DNA 聚合酶和内切酶 *Pst* I 购自宝生物(大连)工程有限公司, T₄ DNA 连接酶和 cDNA 合成试剂盒为北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂

盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒均购自艾德莱生物科技有限公司; 其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 棉花、大豆、拟南芥 RNA 的提取及目的基因的扩增 分别选取棉花、大豆、拟南芥 3 种植物的幼嫩叶片为材料提取总 RNA, 提取步骤按照试剂盒的说明书进行操作。

cDNA 的合成根据试剂盒操作说明书进行, 合成 cDNA 第 1 链。根据 NCBI 上已发表的棉花 *CLA* 基因序列(GenBank 登录号 EF051346.1)、大豆 *CLA* 基因序列(GenBank 登录号 FJ830452.1) 和拟南芥 *CLA* 基因序列(GenBank 登录号 NM-417647.2), 我们选择了上述 3 个 *CLA* 基因的部分编码片段为目标片段, 棉花、大豆、拟南芥的克隆片段总长度分别约为 500、434、504 bp。利用 Primer 3.0 在线引物设计软件分别对 3 种 *CLA* 基因设计引物(表 1), PCR 引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

分别以棉花、大豆、拟南芥的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

表 1 *CLA* 基因的扩增引物

Tab. 1 The primers used for amplifying *CLA* fragments

引物名称 Name of primers	引物序列(5'→3') Sequence of primers(5'→3')
GbCLA-F	GAGGAGAAGAGCCCTATGATGAGTAGATTGCAC
GbCLA-R	CGACGACAAGACCCTCACAACATCGATGATTTAG
GmCLA-F	GAGGAGAAGAGCCCTGAAAAGGTCGGCTTCATCAG
GmCLA-R	CGACGACAAGACCCTGGTGGAACTGGCATGAATCT
AtCLA-F	GAGGAGAAGAGCCCTCCCTTTGCCTTTGTCATA
AtCLA-R	CGACGACAAGACCCTCTTACTGTGGCTCTTCATT

1.2.2 重组载体的构建与鉴定 PCR 产物和用 *Pst* I 单酶切后的 pYY13 质粒经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后, 分别对目的基因和质粒进行 T₄ DNA 聚合酶的处理, 反应条件: 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。将 pYY13 连上 (dTTP)_n, 目的基因连上 (dATP)_n, 然后分别取上述处理过的质粒 1 μL 和目的基因 5 μL 混合(质粒的总量应大于目的基因总量的 5 倍), 22 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 min, 完成连接反应。

将构建好的重组载体 pYY13-*CLA* 转入大肠杆菌 DH5 α 中, 操作依据《分子克隆实验指南》^[11]。重组质粒经 PCR 鉴定后送至南京金思瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 病毒诱导的蕹菜基因沉默体系的构建 以气候箱培养的四叶期蕹菜幼苗为试验材料, 通过氯

化钙转化法把空载 pYY13(对照)和 3 种不同的 pYY13-*CLA* 转入农杆菌 GV3101。用 5 mL 含有适量卡那霉素的 LB 培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜, 挑取阳性克隆于 5 mL 的 LB 培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。次日用 50 mL 含 10 mmol/L MES 和 20 mmol/L 乙酰丁香酮的 LB 培养基转接 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养菌液至 OD₆₀₀ 值约为 2.0, 离心收集菌体。用侵染缓冲液(液体 1/2 MS、10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES 和 20 mmol/L 乙酰丁香酮)悬浮菌液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 h 后即可侵染。用去掉针头的一次性注射器通过压迫法注射蕹菜第 4 片真叶背面。

被侵染的蕹菜于 22 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养过夜, 然后在 22 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30% 和光/暗周期为 16 h/8 h 的人工气候箱内培养, 观察被侵染蕹菜的表型变化。

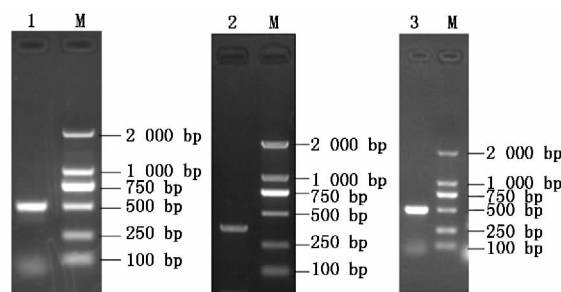
1.2.4 RT-PCR 检测 *CLA* 基因沉默效果 根据说明书提取对照薺菜植株和 *CLA* 沉默薺菜植株的总 RNA ,并合成 cDNA 第一链。采用半定量 RT-PCR 方法检测沉默植株中 *CLA* 基因 mRNA 的沉默效果 ,以拟南芥 *CLA* 基因引物扩增 *CLA* 基因 ,PCR 扩增程序同上(1. 2. 1) 。选用拟南芥 *Actin* 基因(GenBank 登录号 NM_179953.2) 作为内参 ,利用 Primer 3.0 在线引物设计软件对 *Actin* 基因设计引物 ,上游引物 5'-GAGACAGCCAAAACCAGCTC-3'和下游引物 5'-TGAACAATCGATGGACCTGA-3'。PCR 扩增条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s 60 ℃ 退火 45 s , 72 ℃ 延伸 45 s 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。以合成的 cDNA 为模板 ,对内参基因和目的基因分别进行 20 25 30 和 35 个循环的 PCR 扩增 ,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 薺菜 *CLA* 基因的克隆与 *GbCLA*、*GmCLA*、*AtCLA* 基因的同源性比较 将 1.2.4 得到的薺菜 *CLA* 基因的部分片段构建至克隆载体 pMD18-T 载体中 ,送至南京金思瑞生物科技有限公司进行测序 ,并利用 DNAMAN 软件将其序列与 *GbCLA*、*GmCLA*、*AtCLA* 序列进行同源性分析和构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 棉花、大豆、拟南芥总 RNA 的提取及目的基因的检测结果

分别以棉花、大豆、拟南芥的幼嫩叶片为材料提取其总 RNA ,得到质量较高的 RNA。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR ,再分别以其相应的 *CLA* 基因的特异引物进行 PCR 扩增目的基因 ,结果表明已成功扩增出 3 个目的基因(图 1) 。

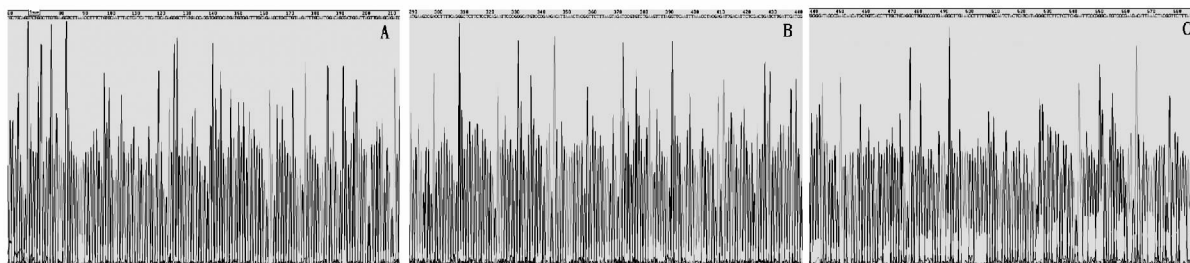


1. *AtCLA* 的 PCR 产物; 2. *GmCLA* 的 PCR 产物;
3. *GbCLA* 的 PCR 产物; M. DL2000。

1. PCR product of *AtCLA* fragment; 2. PCR product of *GmCLA* fragment; 3. PCR product of *GbCLA* fragment; M. DL2000.

图 1 *CLA* 基因片段 PCR 产物

Fig.1 The PCR products of *CLA* fragments

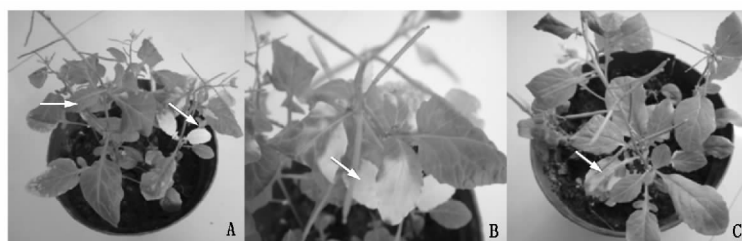


A. *AtCLA* 基因片段; B. *GmCLA* 基因片段; C. *GbCLA* 基因片段。

A. *AtCLA*; B. *GmCLA*; C. *GbCLA*.

图 2 重组质粒的部分测序结果

Fig.2 The sequencing results of recombinant vector pYY13-*CLA*



A ~ C. 分别为 *AtCLA*、*GmCLA*、*GbCLA* 基因侵染后的表型(细箭头为对照 ,粗箭头为沉默植株) 。

A ~ C. Represent the phenotype of *R. indica* 20 days after inoculation with pYY13-*AtCLA* ,pYY13-*GmCLA* and pYY13-*GbCLA* respectively (Thin arrow was control ,thick arrow were silencing plants) .

图 3 被病毒载体侵染 20 d 后薺菜的表型变化

Fig.3 The phenotypic changes of *R. indica* 20 days after inoculation

2.2 重组载体的鉴定结果

将 3 个目的基因和病毒载体 pYY13 分别进行加 A、T 处理后 ,通过 T₄ DNA 聚合酶的连接构建重

组载体 pYY13-*CLA* ,重组质粒经 PCR 鉴定后送至南京金斯瑞公司进行测序 ,通过单向测序结果证实 3 个目的基因均成功插入到 pYY13 载体中 ,说明

VIGS 载体构建成功(图2)。

2.3 接种后蕹菜的表型观察结果

3 种沉默载体浸染的植株,接种 15~20 d 后发现新长出的叶片均出现了不同程度的光漂白现象,而阴性对照植株没有白化现象的出现(图3),表明成功构建了蕹菜的 VIGS 体系。

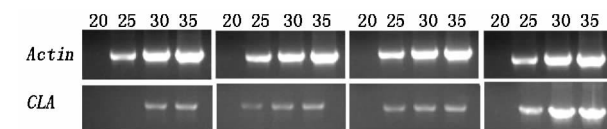
2.4 病毒诱导基因沉默的 RT-PCR 检测结果

采用 RT-PCR 检测沉默后及对照的植株 *CLA* 基因的表达情况,经琼脂糖电泳检测发现 3 种 *CLA* 基因沉默植株叶片的 *CLA* 基因表达量均显著低于对照植株(图4),在分子水平上进一步说明蕹菜 VIGS 体系构建成功。

2.5 *AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 和 *RiCLA* 基因的同源性分析

将克隆的蕹菜 *CLA* 基因(*RiCLA*)的部分片段测序后,采用 DNAMAN 软件对 *RiCLA*、*AtCLA*、*GbCLA*、

GmCLA 进行同源性分析,结果显示 *AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 和 *RiCLA* 的同源性分别为 95%、77%、78% (图5) 系统发育树显示 *AtCLA* 和 *RiCLA* 的同源性较高聚在一支上,*GbCLA*、*GmCLA* 聚在另一支上(图6)。



20 25 30 35 表示 PCR 循环数; *Actin* 作为内参对照; CK: 对照植株; 1. *AtCLA* 沉默的蕹菜植株; 2. *GmCLA* 沉默的蕹菜植株; 3. *GbCLA* 沉默的蕹菜植株。

20 25 30 and 35 stand for cycles of RT-PCR; Levels of *Actin* transcript were determined as internal controls; CK: Negative control plant; 1. *R. indica* of *AtCLA* silencing; 2. *R. indica* of *GmCLA* silencing; 3. *R. indica* of *GbCLA* silencing.

图4 蕹菜 *CLA* 基因沉默的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis to show the effect of VIGS on *CLA* gene in *R. indica* plants

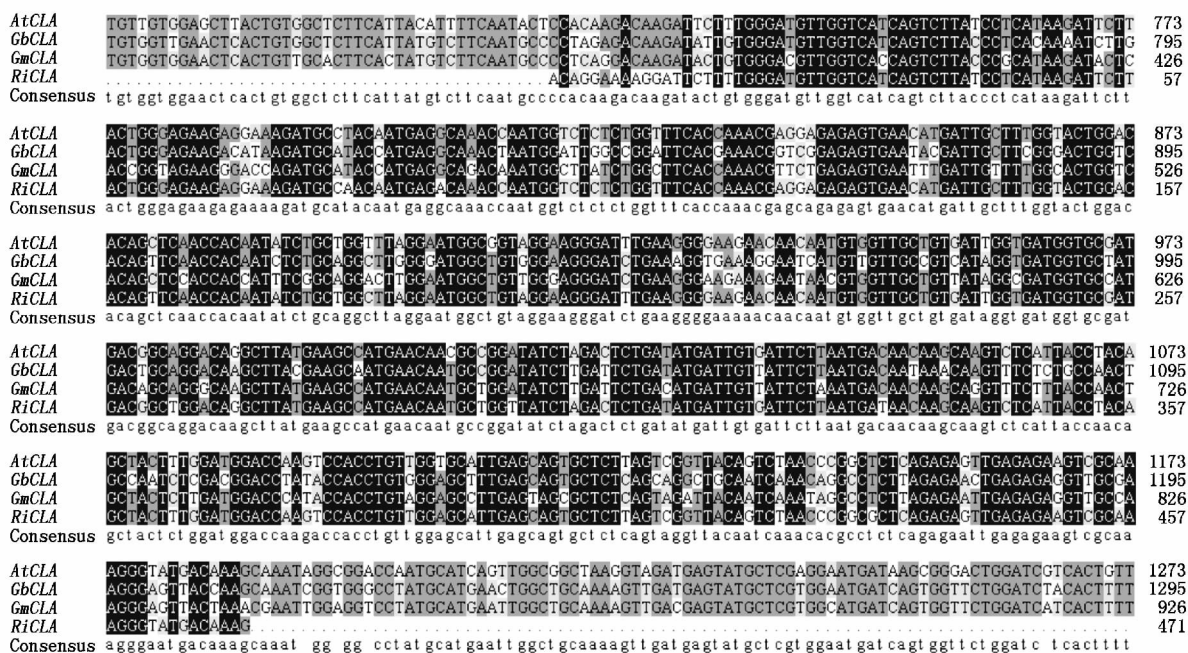


图5 *AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 和 *RiCLA* 基因的同源性比较

Fig. 5 The homologous comparisons of *AtCLA*, *GbCLA*, *GmCLA* and *RiCLA*

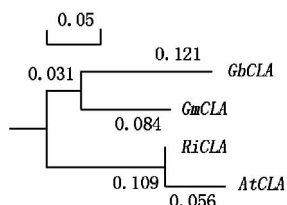


图6 *AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 和 *RiCLA* 基因的系统发育树

Fig. 6 The phylogenetic tree of *AtCLA*, *GbCLA*, *GmCLA* and *RiCLA*

3 讨论

20 世纪 90 年代末期,来自美国和英国的 3 位

学者^[12-14]分别采用带有八氢番茄红素脱氢酶基因的不同病毒载体侵染本氏烟,导致了目的基因的沉默,从而开创了 VIGS 技术在研究植物基因功能的先河。

本试验所用的病毒载体为烟草脆裂病毒载体 pYY13 经 pYL170 和 pYY12 改造而成。该载体含有 2 个 linker 接头,便于外源基因的插入,且在 2 个接头之间插入了 1 个 *ccdB* 自杀基因,含 *ccdB* 基因的载体只能在 DB3.1 这种特定的菌株中存活,不能够在普通的大肠杆菌中存活,因此可高效的回收连有目的基因的阳性克隆^[15]。TRV-VIGS 载体与其他病毒载体相比具有插入目的基因长、诱导基因沉默

的效率、持久性长、能侵染植株的大部分组织以及对宿主不会造成明显的伤害等优点,已经成为研究基因沉默的最常用载体^[16-17]。同时 TRV 载体拓展了宿主范围,据报道,TRV 的宿主范围包括单子叶植物在内的 12 个属 50 多个物种,还可以应用到比较重要的农作物,由此可见,TRV 载体应用的广泛性和实用价值。

研究发现,用 400 ~ 500 bp 基因片段重组的病毒沉默载体侵染植株,基因沉默效果显著^[18]。本研究的试验结果也印证了这一理论。有效的基因沉默不仅与插入片段的大小有关,还受环境条件的影响^[19]。首先,不同时期的植物对病毒的侵染具有不同的敏感性,株龄过低的植株对病毒的防御能力较低,且侵染时也不易操作;株龄过高,则会降低植株对沉默载体的敏感性。因此,适宜的侵染时期对于侵染效果有重要的影响。本研究选择蕹菜的四叶期,这一时期的植株对于沉默载体的敏感性最为适宜,且容易对植株操作。其次,温度是影响病毒在植物体内传播的另一重要因素,不同病毒在不同植物体内的传播速度是不同的,因此,植物所需的有效沉默温度,对于不同的载体也不相同。研究表明,TRV 侵染番茄,在 22 °C 或者更低的温度下可诱导较好的沉默表型的发生。低温低湿的条件有利于有效的延长沉默时间以及增强沉默强度^[20]。然而,也有人在用 TRV-VIGS 载体侵染烟草时发现,合适的沉默温度是 25 °C 左右^[21-22]。因此,对于温度及湿度的控制在一定程度上影响了沉默效果。试验发现,在温/湿可控的光照气候培养箱中进行基因沉默效果显著,而在人工温室和试验田中进行基因沉默的效果不明显。此外,不同的侵染方法也可以对基因沉默的效果产生影响^[23],目前较理想的侵染方法是通过按压注射将转有重组病毒载体的农杆菌注入植物体内,这种侵染方法可使农杆菌高效的侵入植株体内。

由于目前对蕹菜的研究较少,因此本试验利用转化有 *AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 基因的 TRV 对蕹菜进行沉默,结果发现,上述 3 种沉默载体均能使蕹菜出现光漂白现象,且肉眼观察和半定量 RT-PCR 的结果显示,采用 *AtCLA* 基因侵染的沉默植株白化程度较其余 2 种稍强,说明了不同物种的 *CLA* 基因同源性不同可以导致 VIGS 的效果差异,同为十字花科的蕹菜和拟南芥的 *CLA* 基因的同源性更高,产生的 VIGS 效果较好。进而本研究利用 *AtCLA* 基因扩增的引物对 *RiCLA* 进行扩增并测序,序列比对显示,*AtCLA*、*GbCLA*、*GmCLA* 和 *RiCLA* 的同源性分别为 95%、77%、78%,由此推断,序列间的同源性在

77% 以上均可引起相同的沉默效果, Holzberg 等^[24]学者的研究认为,85% 以上的同源性就能引起有效的沉默,本试验为 VIGS 同源片段的扩增提供了新的理论依据。

本试验所使用的研究材料——蕹菜,是我国的一味传统中药,据《本草纲目》记载,它具有祛痰止咳、解表散寒、活血解毒、利湿退黄的功效。其价值不仅体现在药用和食用价值上,蕹菜还具有抗旱、耐渍、耐瘠薄、抗菌核病、结实率高等优异性状^[25],说明蕹菜在科研领域具有潜在的研究价值。同时,蕹菜病毒诱导基因沉默的成功,在实践上也表明了它作为新型模式植物的前景与潜力。相信在不久的将来,蕹菜将作为新型模式植物为生物学的研究和发展做出巨大的贡献。

参考文献:

- [1] Tijsterman M, Ketting R F, Plasterk R H A. The genetics of RNA silencing [J]. Annual Review of Genetics, 2002, 36(1): 489 - 519.
- [2] D C Baulcombe. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(2): 109 - 113.
- [3] M H Kumagai, J Donson, G della-Cioppa *et al.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(5): 1679 - 1683.
- [4] 马红珍, 裴冬丽, 李成伟, 等. 病毒诱导番茄的基因沉默 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(8): 1531 - 1537.
- [5] Brigneti G, Martín-Hernández A M, Jin H *et al.* Virus-induced gene silencing in *Solanum* species [J]. Plant Journal, 2004, 39(2): 264 - 272.
- [6] Chung E, Seong E, Kim Y C *et al.* A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang) [J]. Molecules and Cells, 2004, 17(2): 377 - 380.
- [7] Igarashi A, Yamagata K, Sugawara 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.
- [8] Burch-Smith T M, Schiff M, Liu Y *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2006, 142(1): 21 - 27.
- [9] Bruun-Rasmussen M, Madsen C T, Jessing S *et al.* Stability of Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(11): 1323 - 1331.

- [10] T W Goodwin. The biochemistry of the carotenoids ,Vol. 1 ,Plants. 2nd ed [M]. London: Chapman and Hall , 1980.
- [11] J. 萨姆布鲁克 ,D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社 2002 8: 27.
- [12] Ruiz M T ,Voinnet O ,Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing [J]. The Plant Cell Online ,1998 ,10(6) : 937 – 946.
- [13] Kjemtrup S ,Sampson K S ,Peele C G *et al.* Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus [J]. The Plant Journal ,1998 ,14(1) : 91 – 100.
- [14] Kumagai M H ,Donson J ,Della-Cioppa G *et al.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences ,1995 ,92(5) : 1679 – 1683.
- [15] Dong Y ,Burch-Smith T M ,Liu Y L *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.
- [16] Zhu X H ,Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing as a tool to identify host genes affecting viral pathogenicity [J]. Plant Virology Protocols Methods in Molecular Biology 2008 ,451: 641 – 648.
- [17] Senthil-Kumar M ,Hema R ,Anand Ajith *et al.* A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing [J]. New Phytologist ,2007 ,176 (4) : 782 – 791.
- [18] Liu E ,Page J E. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing(VIGS) using tobacco rattle virus [J]. Plant Methods 2008 ,4(5) : 1 – 13.
- [19] 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 Journal , 2004 ,39(5) : 734 – 746.
- [20] 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]. Molecules and Cells ,2006 ,21 (1) : 153 – 160.
- [21] Ekengren S K ,Liu Y ,Schiff M *et al.* Two MAPK cascades ,NPR1 ,and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato [J]. Plant Journal: for cell and molecular biology ,2003 ,36 (6) : 905 – 917.
- [22] Nethra P ,Nataraja K N ,Rama N *et al.* Standardization of environment conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector [J]. Current Science ,2006 ,90(3) : 431 – 435.
- [23] Hartl M ,Merker H ,Schmidt D D *et al.* Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls [J]. New Phytologist 2008 ,179(2) : 356 – 365.
- [24] Holzberg S ,Brosio P ,Gross C *et al.* Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. Plant journal: for cell and molecular biology ,2002 ,30 (3) : 315 – 327.
- [25] 戴兴临 ,程春明 ,宋来强 ,等. 油菜 × 蔊菜远缘杂交创新油菜种质资源研究 [J]. 植物遗传资源学报 ,2005 , 6(2) : 242 – 244.