

病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用*

陶小荣 周雪平** 崔晓峰 钱亚娟

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要 RNA 介导的基因沉默是近年来在生物体中发现的一种基于核酸水平高度保守的特异性降解机制. 病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 是指携带植物功能基因 cDNA 的病毒在侵染植物体后, 可诱导植物发生基因沉默而出现表型突变, 进而可以研究该目的基因功能. 至今, 已经建立了以 RNA 病毒、DNA 病毒、卫星病毒和 DNA 卫星分子为载体的 VIGS 体系, 这些病毒载体能在多种寄主植物 (包括拟南芥、番茄和大麦) 上有效抑制功能基因的表达. VIGS 已开始应用于 *N* 基因和 *Pto* 基因介导的抗性信号途径中关键基因的功能研究、抗病毒相关的寄主因子研究以及植物代谢和发育调控研究. 在当前植物基因组或 EST 序列大量测定的情况下, VIGS 为植物基因功能鉴定提供了有效的技术平台.

关键词 病毒诱导的基因沉默, 基因功能, 病毒载体

学科分类号 Q7, Q94

RNA 介导的基因沉默 (RNA-mediated gene silencing) 是近年来发现的一种基于核酸水平高度保守的特异性降解机制, 这一机制在线虫和动物中称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi), 在真菌中称为基因消除 (quelling), 而在植物中称为转录后基因沉默 (post-transcription gene silencing, PTGS)^[1]. 病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 是指携带植物功能基因 cDNA 的病毒, 在侵染植物体后可诱导植物发生基因沉默而出现表型突变, 从而可以通过植物表型或生理指标上的变化反映该基因的功能. 在当前植物全长基因组序列或序列表达标签 (expressed sequence tags, EST) 大量测定的情况下, 利用 VIGS 的方法将这些序列插入病毒载体中就可以验证这些基因的功能, 因而 VIGS 为研究植物基因功能提供了强有力的工具^[2]. 本文介绍了近年来 VIGS 体系的建立及在植物基因功能研究中的应用.

1 病毒诱导的基因沉默 (VIGS)

1.1 VIGS 的建立与发展

早在 1995 年, Kumagai 等^[3] 在烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 上插入了一段八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) cDNA 片段, PDS 是类胡萝卜素合成途径中的一个关键酶, 而类胡萝卜素在植物中具有光保护作用, 当带有该 cDNA 片段的 TMV 重组病毒侵染烟草后, 侵染植物的叶片变成白色, 被感染植株产生的白化效

应是因为 PDS mRNA 水平显著降低引起的. 1998 年, Baulcombe 研究组^[4] 在马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 基因组上同样插入了一段 PDS cDNA, 重组病毒侵染植物后也出现了失去光保护作用的白化效应, 因此他们提出 VIGS 可以有效地抑制植物内源基因的表达, 从而可以利用病毒载体进行未知基因的功能鉴定. 2001 年, Baulcombe 研究组^[5] 又报道了以烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 为载体的 VIGS 体系, 比较表明, TRV 载体诱导基因沉默的效率和持久性都优于 PVX 载体 (表 1).

不仅 RNA 病毒能诱导植物发生基因沉默, DNA 病毒也能诱导基因沉默. 1998 年, 北卡罗那州立大学 Robertson 研究组^[6] 利用双生病毒科的番茄金花叶病毒 (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV), 初步建立了以 DNA 病毒诱导的基因沉默来研究植物基因功能的体系. 他们利用 TGMV DNA-A 为载体, 在本氏烟上成功诱导了镁离子螯合酶的关键基因 *Su* (Sulfur) 和转基因 *luc* 荧光蛋白基因发生沉默, 前一个基因被沉默后因为叶绿素不能合成使叶片成为黄色, 后一个基因被沉默后转

* 国家杰出青年基金 (30125032) 和国家自然科学基金 (30300194) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86971680, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

收稿日期: 2004-03-02, 接受日期: 2004-05-30

基因 *luc* 植株不再发荧光^[6]. 但是 TGMV DNA-A 载体诱导植物发生基因沉默后的效率较低, 并且病毒本身会产生较强的病毒症状, 因此 Robertson 研究组^[7]于 2001 年又报道了以 TGMV DNA-B 为载体的

VIGS 体系, DNA-B 载体诱导的基因沉默在沉默效率和持久性上都比 DNA-A 载体大为提高, 病毒在植株中产生的症状也有所减轻 (表 1).

Table 1 The establishment of virus-induced gene silencing in plants

表 1 病毒诱导的基因沉默体系的建立

病毒	基因组类型	插入片段长度	植物	目标基因
TMV	单链正义 RNA	651 bp	本氏烟	<i>PDS</i>
PVX	单链正义 RNA	23 ~ 818 bp (转基因 <i>GFP</i>), 33 ~ 500 bp (内源基因)	本氏烟	<i>PDS</i> , <i>Rubisco</i> 小亚基, 转基因 <i>GFP</i>
TRV	单链正义 RNA	110 ~ 872 bp	本氏烟 番茄	<i>PDS</i> , <i>Rubisco</i> 小亚基, <i>LEAFY</i> , 转基因 <i>GFP</i> <i>PDS</i>
BSMV	单链正义 RNA	185 ~ 1 215 bp	大麦	<i>PDS</i>
TGMV	单链环形 DNA	92 ~ 790 bp (DNA-A), 92 ~ 360 bp (DNA-B)	本氏烟	<i>Su</i> , 转基因 <i>luc</i>
CbLCV	单链环形 DNA	360 ~ 388 bp	拟南芥	<i>PDS</i> , <i>Su</i> , 转基因 <i>GFP</i>
STMV	单链正义 RNA	142 ~ 439 bp	普通烟	<i>PDS</i> 等 13 个基因
TYLCCNV DNA β	单链环形 DNA	150 ~ 521 bp	本氏烟, 心叶烟, 三生烟, 番茄	<i>PDS</i> , <i>Su</i> , <i>PCNA</i> , 转基因 <i>GFP</i>

继 RNA 病毒和 DNA 病毒为载体的 VIGS 体系之后, Gossele 等^[8] (2002 年) 发展了一种基于卫星病毒的 VIGS 体系, 他们将伴随 TMV U2 的卫星病毒 (*Satellite tobacco mosaic virus*, STMV) 基因组进行了改造, 使它具有插入外源片段的能力, 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 (表 1).

笔者实验室最近建立了一种以新型的 DNA 卫星分子为载体的 VIGS 体系. 在对中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV) 的研究中, 分离和鉴定了一种新型的 DNA 卫星分子 (DNA β). 对 DNA β 上的 β C1 基因的突变研究表明, 虽然 β C1 对于致病是必需的, 但对于 DNA β 的复制却并非必需. 因此对 DNA β 上的 β C1 基因进行了缺失和引入多克隆位点 (multiple cloning sites, MCS), 将其改造为一种 DNA 卫星载体, 该卫星 DNA 载体既可以有效地抑制转基因 *GFP* 的表达, 也可以高效抑制内源基因 *PDS* 和 *Su* 的表达. 改造的 DNA 卫星沉默载体本身在植物中并不产生任何症状, 因此在最大程度上减

少了对 VIGS 沉默表型的干扰效应 (表 1)^[9].

大部分 VIGS 体系都是在本氏烟上建立的, 近年来在多种模式植物或重要经济作物上也逐渐建立了 VIGS 的体系 (表 1). 拟南芥是植物中最为重要的模式植物之一, 其全长基因组序列在 2001 年已经全部测定完毕, 它的功能基因组研究为分子生物学作出了重大贡献. 2002 年, Turnage 等^[10]利用大白菜曲叶病毒 (*Cabbage leaf curl virus*, CbLCV) 在拟南芥上成功建立了 VIGS 体系. Liu 等^[11]利用 TRV 在番茄上建立了 VIGS 体系, 从而可以对已经公布的番茄 EST 文库进行功能鉴定. 2002 年, Holzberg 等^[12]利用大麦线条花叶病毒 (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) 首次在单子叶植物大麦上成功抑制了 *PDS* 基因的表达, 从而为研究大麦等单子叶植物的基因功能提供了有效的研究工具. 笔者研究组建立的基于 TYLCCNV 卫星 DNA β 分子的 VIGS 系统, 可以在 TYLCCNV 的几乎所有寄主植物 (包括本氏烟、心叶烟、三生烟和番茄) 上诱导基因沉默^[9]. 卫星 DNA β 分子已在亚洲和非洲的多种重要经济作物上发现, 因此基于卫星 DNA β 分子的基因沉默载体系统可以应用于其他重要经济作物的基因功能研究.

1.2 VIGS 中引起有效沉默的外源片段长度

对于植物 RNA 病毒载体, 插入 110 个碱基以上的 cDNA 片段就能有效诱导基因沉默, PVX、TRV、TMV 或 BSMV 等病毒载体携带外源片段的长度都可以达到 1 kb, 因此都可有效诱导基因沉默. 对于 DNA 病毒载体, TGMV DNA-A 载体插入片段的长度达 790 bp, 而 92 bp 的 *Su* cDNA 片段就能够有效抑制 *Su* 基因的表达. 卫星病毒载体在插入片段 142 ~ 439 bp 的范围内都能有效抑制植物内源基因的表达. 笔者研究组构建的卫星 DNA 载体在插入片段 150 ~ 521 bp 范围内可以有效地诱导植物内源基因发生沉默 (表 1).

对动物细胞的 RNAi 研究发现, 最小为 19 ~ 21 bp 的片段就可以有效抑制内源基因表达. 在植物中, 对于转基因 *GFP* 来说, 诱导基因沉默的最小插入片段为 23 bp, 更小的片段就不能诱发基因沉默. 但是对于植物内源功能基因来说, 在 PVX 载体上插入 33 bp 才可以诱导 *PDS* 发生沉默, 并且还具区域与位置的效应, 在中心区域可以沉默, 在其他区域则不能, 有些甚至插入 52 bp 也不能被沉默. 插入片段的方向对沉默也具有影响, 对于转基因或内源基因, 在插入沉默的最小片段时, 反向插入都比正向插入更容易引起基因沉默^[13].

1.3 VIGS 的优缺点

传统的筛选功能基因的方法是通过 T-DNA 或转座子随机插入植物基因组获得突变体库, 进而从植物表型突变筛选基因. 这是一种有效的方法, 但周期长、工作量大、过程繁琐, 而且依赖于植物遗传转化体系的成熟度. VIGS 研究基因组功能的优点在于它构建简易、周期性短、成本较低, 一般构建重组载体到接种植物进行功能鉴定只需几个星期时间, 因此可以大规模进行基因组序列或 EST 序列的功能鉴定. 在传统的基因筛选过程中, 对一些胚发育期必需的基因插入突变将导致致死型突变, 从而得不到突变表型, 而 VIGS 是对成株植物诱导产生表型突变, 因此它可以对胚发育期致死基因的功能进行研究. 对基因家族的成员研究中, 传统的插入突变导致一个家族成员的失活, 但家族的其他成员可弥补其功能, 从而无法研究其家族成员的功能, 而 VIGS 是通过同源性起作用, 如选取所有家族成员的高度保守区, 就能沉默整个家族的成员. 已报道 VIGS 可以有效地抑制 *Rubisco* 小亚基基因家族的表达^[14].

VIGS 的不足之处在于它必需依赖于病毒载体

在寄主植物上建立有效的 VIGS 体系, 如在水稻上还没有一种病毒载体在该植物上建立高效的 VIGS 体系, 目前还不能利用 VIGS 在该植物上研究基因功能. 因此 VIGS 的一个重要发展方向就是要在重要的经济植物如大豆、棉花和水稻等作物上建立有效的 VIGS 体系, 从而与传统的研究方法能够相互为用. 另外有些病毒载体本身也能在植物中出现症状或在生理上产生一些变化, 因此在分析 VIGS 沉默表型时, 需注意这些因素对突变表型的干扰.

2 VIGS 的机制

双链 RNA (dsRNA) 是基因沉默的关键起始因子, dsRNA 在体内被一个类似 RNase III 称为 Dicer 的酶降解成小分子干扰性 RNA (small interference RNA, siRNA), siRNA 能够与 RNAase 结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC), 这一 RISC 复合体能够特异性地攻击同源的 mRNA. 近年来, 在拟南芥中已经分离鉴定了几个参与基因沉默的关键基因, *SDE1/SGS2* 编码一个类似于依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 而 *SDE3* 编码一个类似于 RNA 螺旋酶的基因, *SGS3* 编码一个功能未知的蛋白质, 缺少其中任何一个基因都不能在拟南芥中诱导基因沉默^[1].

在 RNA 病毒诱导的基因沉默中, 利用 TRV 载体诱导拟南芥突变体 *sde1/sgs2* 发生的基因沉默研究发现, 虽然这些拟南芥突变体自身缺少 RdRp, 但是 TRV 依然能够诱导内源功能基因 *PDS* 发生沉默, 因此在 RNA 病毒诱导的基因沉默中, 病毒载体是通过自身编码的 RdRp 进行 dsRNA 的合成, 而植物来源的 RdRp 对于 RNA 病毒可能是多余的 (图 1)^[15].

对于 DNA 病毒诱导的基因沉默, DNA 病毒本身并不编码 RdRp, 因此它如何诱导基因沉默的机制尚不清楚. 在 TGMV 诱导的基因沉默中, 它的基因组共同区中具有双向转录的启动子, 双向转录产生的正向和反向的转录物可能因为相互重叠而形成 dsRNA, 从而启动基因沉默; 另一种机制可能是植物 cDNA 片段在双生病毒基因组中转录成异常的 mRNA (aberrant RNA) 后, 在植物内源 RdRp 作用下形成 dsRNA (图 1). 在卫星 DNA 载体诱导的基因沉默中, 卫星 DNA β 并不含有双向转录的启动子, 很有可能不存在正反向 RNA 转录物的相互重叠而产生 dsRNA 的途径, 它诱导基因沉默的

机制可能也是由病毒基因组转录产生异常的 mRNA，然后通过植物内源的 RdRp 合成 dsRNA 从

而诱导植物发生基因沉默（图 1）。

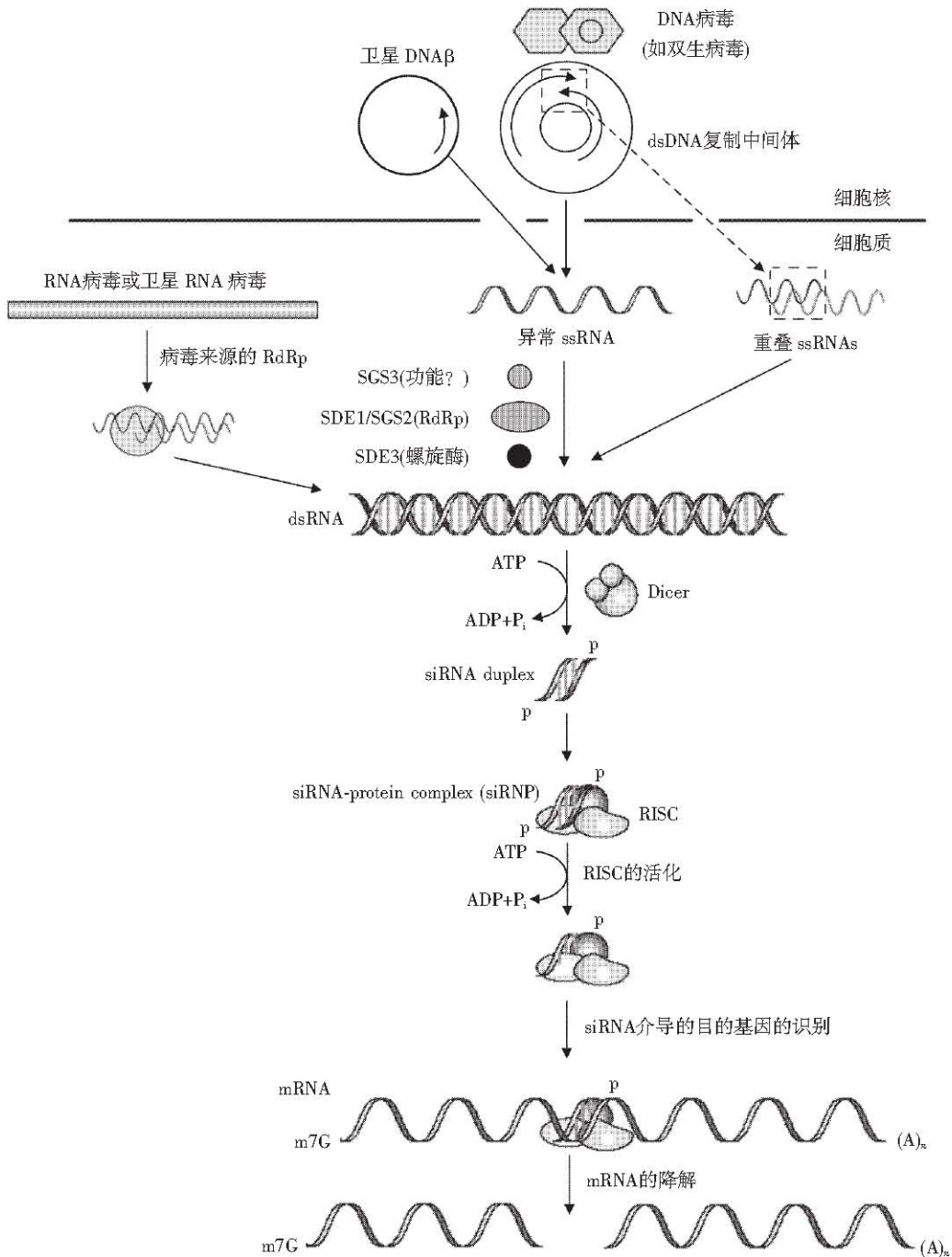


Fig. 1 The mechanism of virus induced gene silencing^[1]

图 1 病毒诱导基因沉默的机制^[1]

在 VIGS 中存在沉默的系统信号。当 PVX 缺失移动蛋白基因 (MP) 后，缺失病毒只能局限于侵染细胞中复制，不能进行系统移动。当缺失 MP 的

PVX 载体插入 GFP 片段后，重组病毒不但能够在转基因 GFP 本氏烟的局部叶片中诱导 GFP 沉默，还能够在系统叶片中抑制 GFP 的表达，表明存在

沉默信号从局部叶片传送到系统叶片上因而诱导了 *GFP* 的沉默^[1]. 当缺失 *MP* 的 *PVX* 插入 *PDS* 时, 该重组载体侵染本氏烟后, 在邻近病毒侵染的细胞也出现 *PDS* 沉默后的白化表型 (虽然在这些细胞中没有 *PVX* 的感染), 但是在感染植株的系统叶中却并没有发现 *PDS* 的白化表型^[1], 因此在病毒诱导内源基因发生沉默的过程中, 基因沉默可能需要病毒载体持续不断地进行复制和转录, 产生足够的 dsRNA 或持续不断地产生系统沉默信号才能诱导内源基因发生沉默.

3 利用 VIGS 进行植物基因组的功能研究

随着 VIGS 体系的不断成熟, VIGS 开始逐渐应用于植物的抗病反应、生长发育以及代谢调控中基因的功能研究 (表 2). 早在 2000 年, Burton 用 *PVX* 载体对植物细胞壁的纤维素合成酶 (cellulose synthase genes, *CesA*) 基因进行了研究, 当带有 *CesA* cDNA 片段的 *PVX* 重组载体侵染本氏烟后, 细胞壁丧失合成纤维素的能力, 在植物叶片下表皮出现松散膨胀不正常的球形细胞, 同时整个植株伴随着矮化现象^[2].

Table 2 Identification of functional gene in plants by VIGS

表 2 利用 VIGS 鉴定植物功能基因

目标基因	接种植物	病毒	突变表型
#13	本氏烟	TRV	TMV 的感病性增加
#3	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>CDPK2</i>	本氏烟	TRV	过敏反应推迟
<i>CESA</i>	本氏烟	<i>PVX</i>	细胞壁扩张
<i>GSN3</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>GSN8</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>CTR1</i>	番茄	TRV	乙烯过量积累、植株矮化
<i>EDS1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
	本氏烟	TRV	<i>Bs4</i> 介导的对 <i>AvrBs4</i> 的抗性丧失
<i>Hsp90</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失 <i>Rx</i> 介导的对 <i>PVX</i> 的抗性丧失 <i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>MEK1</i>	番茄	TRV	<i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>MEK2</i>	番茄	TRV	<i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>NbrbohA</i> 与 <i>NbrbohB</i>	本氏烟	<i>PVX</i>	H ₂ O ₂ 的积累及对植物病原菌的抗性降低
<i>NPK1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>NPR1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
	番茄	TRV	<i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>NTF6</i>	番茄	TRV	<i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>P58 (IPK)</i>	本氏烟	TRV	病毒积累浓度降低
<i>RAR1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>SGT1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
	本氏烟	TRV	<i>Bs4</i> 介导的对 <i>AvrBs4</i> 抗性丧失
<i>SIPK</i>	本氏烟	<i>PVX</i>	减弱 N 基因介导的抗性
<i>SKP1</i>	本氏烟	TRV	N 介导的对 TMV 的抗性丧失
<i>TGA1a</i> 与 <i>TGA2.2</i>	番茄	TRV	<i>Pto</i> 介导的对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性丧失
<i>WIPK</i>	本氏烟	<i>PVX</i>	减弱 N 基因介导的抗性

利用 VIGS 对寄主植物参与抗病信号途径以及抗病因子的研究,是目前开展最为广泛的领域。*N* 基因介导对 TMV 的抗性是最为经典的一个病原互作研究之一, Peart 等和 Liu 等几乎同时利用 TRV 诱导的基因沉默对 *N* 基因介导的对 TMV 的抗性反应中参与抗性信号传递的基因进行了研究,他们发现, *EDS1*、*RAR1*, *RAR1* 下游的基因 *SGT1*、与 *SGT1* 互作的 *SKP1* 以及水杨酸依赖途径的 *NPR1/NIM1* 基因对于 *N* 基因介导的抗性都是必需的^[2]。利用 VIGS 技术对烟草中发现的两个促细胞分裂素激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs)——水杨酸诱导蛋白激酶 NbSIPK (salicylic acid-induced protein kinase, SIPK) 和创伤诱导蛋白激酶 NbWIPK (wounding-induced protein kinase, WIPK) 基因进行沉默后发现,这两个基因对于 *N* 介导的抗性都具有正调控作用, MAPKs 的上游调控基因——MAPKs 的激酶 (MAPK kinase) 基因 *NtMEK2* 对于 *N* 介导的抗性也具有正调控作用^[16]。对 MAPKs 激酶的激酶基因 *NPK1* 的沉默表明, *NPK1* 对于 *N* 介导的抗性也是必需的^[2]。在其他抗病毒的途径中,利用 VIGS 发现, *NPK1* 对于另外两个抗性基因 *Bs2* 和 *Rx* 介导的抗性也是必需的^[2]。

病原菌无毒基因引发植物抗病基因的抗性反应,是研究病原互作及其抗病信号转导的重要模式体系。在 *Pto* 介导的对丁香假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性信号途径研究中, Baulcombe 研究组发现, *Hsp90* 对于 *Pto* 介导的对丁香假单胞杆菌抗性是必需的^[17]; Ekengren 等^[18]发现, MAPKs 的两个激酶基因 *MEK1* 与 *MEK2*、MAP 的两个激酶基因 *NTF6* 与 *WIPK*、系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 的关键调控基因 *NPR1* 和转录因子 *TGA1a* 与 *TGA2.2*, 对于 *Pto* 介导的抗性都是必需的, *RAR1* 与 *COI1* 在这一途径中也具有微弱的作用。另外,在利用 VIGS 对 *INF1* 诱导的过敏反应以及对菊苣假单胞杆菌 (*Pseudomonas cichorii*) 的非寄主抗性研究中发现, *WIPK* 及 *SIPK* 激酶对于菊苣假单胞杆菌的非寄主抗性具有正调控作用,但不参与 *INF1* 介导的过敏反应,进一步对 *WIPK* 与 *SIPK* 激酶互作的 *Hsp90* 的研究表明,它对于这两个途径都是必需的^[19]。

VIGS 方法也不断扩展至与植物抗病性相关的各个领域的研究中,对动物中细胞抑制子 (PKR) 的植物同源基因 *P58 (IPK)* 的沉默研究发现,

P58 (IPK) 蛋白被抑制会导致病毒浓度的降低,表明 *P58 (IPK)* 是寄主植物中的一个致病因子^[20]。相反,通过 VIGS 发现,光合系统 II 的氧进化复合体 (oxygen-evolving complex of photosystem II) 基因被抑制后, TMV 的复制增强,表明这个复合体在抗 TMV 侵染过程中发挥作用^[2]。在活性氧调控的研究中,通过 VIGS 对本氏烟中的两个呼吸爆发氧化酶同源基因 (respiratory burst oxidase homologs, *rboh*) *NbrbohA* 和 *NbrbohB* 进行沉默后发现,这两个基因对于 H_2O_2 的积累以及对植物病原菌的抗性都起着重要作用,并且这两个基因沉默后 *INF1* 诱导的过敏反应减弱或延迟^[21]。

VIGS 为研究植物基因组的功能提供了一个快速高通量的技术平台。Baulcombe 研究组对大规模鉴定基因序列的功能进行了尝试,他们在 PVX 载体插入植物的 cDNA 文库,建立了覆盖植物大部分功能基因的病毒基因沉默克隆文库。研究结果表明,测试的 5 000 个 cDNA 克隆中大约有 15% 的烟草 cDNA 能够产生抑制植物生长或发育的突变表型^[22]。他们的研究方法为 VIGS 在植物中进行大规模的基因组功能鉴定展示了广阔的应用前景。

随着基因沉默机制的进一步了解和 VIGS 载体的不断发展,将会在更多的寄主植物上建立 VIGS 体系,特别是像豆科植物等常规方法较难进行基因功能研究的植物,使这些植物的功能基因研究得以有效开展。VIGS 对植物功能基因组的应用范围,已逐渐从植物病理学家熟悉的植物抗病信号传导,扩展到了代谢和发育等领域。随着越来越多基因组序列的测定,与传统的研究基因功能的方法相结合, VIGS 将在植物基因功能研究中广泛应用。

参 考 文 献

- 1 Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*, 2001, **17** (8): 449 ~ 459
- 2 Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Rev Genet*, 2003, **4** (1): 29 ~ 38
- 3 Kumagai M H, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995, **92** (5): 1679 ~ 1683
- 4 Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, **10** (6): 937 ~ 946
- 5 Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 2001, **25** (2): 237 ~ 245
- 6 Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant J*, 1998, **14** (1): 91 ~ 100
- 7 Peele C, Jordan C V, Muangsan N, et al. Silencing of a

- meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J*, 2001, **27** (4): 357 ~ 366
- 8 Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, *et al.* SVISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J*, 2002, **32** (5): 859 ~ 866
- 9 Tao X R, Zhou X P. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J*, 2004, **38** (5): 850 ~ 860
- 10 Turnage M A, Muangsang N, Peele C G, *et al.* Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, **30** (1): 107 ~ 114
- 11 Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 2002, **31** (6): 777 ~ 786
- 12 Holzberg S, Brosio P, Gross C, *et al.* Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J*, 2002, **30** (3): 315 ~ 327
- 13 Thomas C L, Jones L, Baulcombe D C, *et al.* Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J*, 2001, **25** (4): 417 ~ 425
- 14 Jones L, Thomas C L, Maule A J. RNA-DNA Interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell*, 1999, **11** (12): 2291 ~ 2302
- 15 Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 2000, **101** (5): 543 ~ 553
- 16 Jin H L, Liu Y D, Yang K Y, *et al.* Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J*, 2003, **33** (4): 719 ~ 731
- 17 Lu R, Malcuit I, Moffett P, *et al.* High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J*, 2003, **22** (21): 5690 ~ 5699
- 18 Ekengren S K, Liu Y L, Schiff M, *et al.* Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J*, 2003, **36** (6): 905 ~ 917
- 19 Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, *et al.* Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol*, 2003, **4** (5): 383 ~ 391
- 20 Bilgin D D, Liu Y, Schiff M, *et al.* P58 (IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev Cell*, 2003, **4** (5): 651 ~ 661
- 21 Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, *et al.* *Nicotiana benthamiana* gp91 (phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 2003, **15** (3): 706 ~ 718
- 22 Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, *et al.* Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 2003, **30** (4): 296 ~ 303

Virus Induced Gene Silencing And Its Application for Analysis of Genomic Function in Plants*

TAO Xiao-Rong, ZHOU Xue-Ping**, CUI Xiao-Feng, QIAN Ya-Juan

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract RNA silencing is a high conserved mechanism in organisms that involves sequence-specific RNA degradation. For virus induced gene silencing (VIGS), it is induced by infecting a plant with a plant virus that has had its genome modified to include a sequence identical to that in RNA transcribed from the host gene to be silenced. Up to now, various VIGS vectors based on RNA virus, DNA virus, satellite virus or DNA satellite have been established, these VIGS vectors could suppress gene expression effectively in many important plants including *Arabidopsis*, tomato and barley. VIGS vectors have been used to study function of genes involved in the signal transduction of *N*-mediated or *Pto*-mediated resistance, anti-virus mechanism, and plant development and metabolism. With the determination of complete genome sequences or expressed sequence tags, VIGS has recently emerged as a powerful method for identification of gene functions in plants.

Key words virus induced gene silencing, gene function, viral vector

* This work was supported by grants from The National Outstanding Youth Foundation of China (30125032) and The National Natural Sciences Foundation of China (30300194).

** Corresponding author. Tel: 86-571-86971680, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

Received: March 2, 2004 Accepted: May 30, 2004