DOI: 10.11929/j.swfu.202009054

引文格式:杨婷婷,赵立华,邱润霜,等.番茄斑萎病毒2个非结构蛋白 VIGS 体系的初步构建[J].西南林业大学学报(自然 科学),2022,42(2):151–156.

番茄斑萎病毒 2 个非结构蛋白 VIGS 体系的初步构建

杨婷婷^{1,2} 赵立华² 邱润霜^{2,3} 陈 思^{2,3} 张 洁² 李博文^{2,3} 张仲凯² 马长乐¹ (1.西南林业大学园林园艺学院,云南省高校园林植物与观赏园艺重点实验室,云南昆明 650233; 2.云南省农业科学院生物技术与 种质资源研究所,云南省农业生物技术重点实验室,农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室,云南昆明 650223; 3.西南林业大学生命科学学院,云南昆明 650233)

摘要:将番茄斑萎病毒(TSWV)的NSm、NSs基因200 bp左右构建到pTRV-PTV00 沉默载体上,通过农杆菌GV3101浸润本氏烟。注射10 d左右,待注射PDS基因的植株发白,将注射pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSs 以及pTRV-PTV00载体的植株接种TSWV,显症后采集系统叶(接种叶上一叶)应用实时荧光定量PCR检测NSm、NSs基因表达量。通过测定NSm、NSs基因表达量发现NSm基因的沉默效率为86.7%、NSs基因的沉默效率为92.00%。结果表明:通过pTRV-PTV00载体构建NSm、NSs基因沉默载体沉默效率接近90.00%,此载体适用于病毒基因沉默载体的构建,且NSm、NSs基因沉默载体能应用后续基因功能研究。

关键词:本氏烟;番茄斑萎病毒;病毒诱导的基因沉默;非结构蛋白;实时荧光定量 PCR 中图分类号: S718.85 文献标志码:A 文章编号: 2095-1914(2022)02-0151-06

Construction of 2 Non-structural Proteins VIGS System of TSWV

Yang Tingting^{1,2}, Zhao Lihua², Qiu Runshuang^{2,3}, Chen Si^{2,3}, Zhang Jie², Li Bowen^{2,3}, Zhang Zhongkai², Ma Changle¹

(1. Key Laboratory of Landscape Plants and Ornamental Horticulture in Universities of Yunnan, College of Landscape and Horticulture, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China;

2. Key Laboratory of Ministry of Agriculture on Southwest Crop Genetic Resources and Germplasm Creation / Yunnan Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology / Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunning Yunnan

650223, China;

3. College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China)

Abstract: In this study, the sequences of 200 bp of tomato spotted wilt orthotospovirus(TSWV) *NSm*, *NSs* genes were constructed to pTRV–PTV00 silencing vector and infiltrated agrobacterium GV3101 in *Nicotiana benthamiana*. About 10 days after injection, the plants with injecting *PDS* gene became white, the plants with injecting the vectors of pTRV–PTV00–NSm, pTRV–PTV00–NSs and pTRV–PTV00 were inoculated with TSWV. The expression of *NSm* and *NSs* genes was detected by qRT–PCR in the systematic leaves(one leaf above the inoculated leaf) after manifestation, and the gene silencing efficiency was obtained. The silencing efficiency of *NSm* and *NSs* gene was 86.7% and 92.00%, respectively. The results showed that silencing efficiency of *NSm* and *NSs* gene silencing was close to 90.00% constructed by pTRV–PTV00 vector, which was suitable for the construction

收稿日期: 2020-09-24;修回日期: 2020-12-30

基金项目:国家自然科学基金项目(U31560499, 31960531)资助;云南省"云岭学者"培养计划项目(云组通[2015]56) 资助。

第1作者:杨婷婷(1996—),女,硕士研究生。研究方向:植物病毒。Email:2862871387@qq.com。

通信作者:马长乐(1976—),男,教授,博士生导师。研究方向:生物多样性保护研究。Email:mcl@swfu.edu.cn。

of viral gene silencing vectors, and *NSm* and *NSs* gene silencing vectors could be used for subsequent gene function studies.

Key words: *Nicotiana benthamiana*; tomato spotted wilt orthotospovirus; virus-inducedgene silencing; nonstructural protein; real-time quantitative PCR

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*) 与辣椒 (Capsicum annuum)、番茄 (Solanum lycopersicum)均属于茄科(Solanaceae)植物,其最早流 行于澳大利亚,目前在世界各地的实验室被广泛 栽培[1]。本氏烟作为模式植物用于植物-微生物互 作、代谢路径、疫苗生产、合成生物学等方面研 究,同时因其易受多种植物病毒侵染而广泛应用 于病毒的检测和鉴定、病毒诱导的基因沉默的基 因功能验证等方面^[2-3]。TSWV(tomato spotted wilt orthotospovirus)是布尼亚病毒目(Bunyavirales)、番茄斑萎病毒科(Tospoviridae)、正番 茄斑萎病毒属(Orthotospovirus)的代表种,在经 济学和科学研究性上位于世界十大植物病毒的第 2位^[4]。TSWV 在我国西南地区大量发生,致使烟 草、辣椒以及番茄等经济作物减产减量,造成巨 大经济损失[5-7]。本研究通过构建 NSm、NSs 基因 沉默载体,为TSWV 基因功能及致病机理的研究 提供基础材料,并为 TSWV 田间绿色防控奠定基 础和提供技术手段。

病毒诱导基因沉默技术(VIGS)是指一种将 目标基因片段插入病毒载体并使其感染植物,从 而抑制内源基因表达并引起相应的生理和表型变 化的简单、快速、高效的评估植物基因功能的方 法^[8-9]。目前,已发现几十种病毒可用作 VIGS 载 体,如马铃薯病毒 X (PVX)、甘蓝卷叶病毒 (CaLCuV)、烟草脆裂病毒(TRV)、烟草花叶 病毒(TMV)、豌豆早褐变病毒(PEBV)、水 稻东格鲁杆状病毒(RTBV)^[10]等,其中一些已 经成功地应用于代谢途径、植物发育、非生物胁 迫和生物胁迫的基因功能研究中。研究发现用 TRV 载体沉默番茄 MYB80 基因、本氏烟中的高 铁还原酶基因 FROI 以及南非醉茄 (Withania somnifera)中 MVA、MEP 途径的相关基因能显 著增强植物对胁迫的抗性和生长能力^[11-13]。VIGS 技术已应用于植物病毒的防控方面,如沉默甜椒 脂氧合酶基因 CaLOX2, 发现该基因介导了依赖 于茉莉酸(JA)的信号传导,从而导致植株对蓟 马产生抗性[14];将番茄中乙烯信号通路负调控基 因 LeCTR1 沉默,可明显减弱活性氧(ROS)的 积累和叶片卷曲症状,增强植株对印度东部的番 茄曲叶病毒(ToLCJoV)的耐受性^[15];沉默本氏 烟分子伴侣 NbSGT1 基因,可强烈抑制 TSWV 的 NSm 细胞间的移动,进而抑制 TSWV 对本氏烟的 侵染^[16]。与其他 VIGS 载体相比,TRV 能较温和 地侵染植株,并且它可以迅速蔓延到整个植物的 多种组织和器官,包括叶片、花、根和果实以及 分生组织^[17-19],且 TRV 是一种宿主范围广泛的 RNA 病毒,包括本氏烟、拟南芥(Arabidopsis thaliana)、番茄、辣椒、小麦(Triticum aestivum)、玫瑰(Rosa rugosa)、棉花(Gossypium spp.)等^[18, 20-24]。

NSm和NSs是TSWV的非结构蛋白,NSm 为病毒的移动蛋白,辅助病毒粒子在细胞内和细 胞间运动;NSs为病毒沉默抑制子,通过应对植 物RNA沉默防御辅助病毒的侵染^[25-26]。但目前 TSWV 非结构蛋白 NSm和NSs 对病毒系统侵染 及诱导囊泡的机制方面尚不清楚。本研究将 TSWV的NSm、NSs基因构建到载体pTRV-PTV00 上,通过实时荧光定量 PCR 定量分析抗TSWV 的沉默效率,构建TSWV的NSm、NSs基因沉默 载体,这为研究NSm、NSs基因在病毒致病机制 方面提供了前期材料和有力依据,为研究与TSWV 复制、装配密切相关的囊泡的产生机制提供材 料,为实现田间正番茄斑萎病毒属病毒病的绿色 防控提供新的方法。

1 材料及方法

1.1 实验材料

本氏烟种子、TSWV 毒源由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所植物病毒课题组保存提供;含有 PDS 基因菌株、PTV00空载体菌株、PBINTRA 载体的菌株、GV3101 菌株均有昆明植物研究所吴建强课题组提供。NSm和 NSs 基因 PCR 引物根据 GenBank 中 TSWV 己知基因序列(JF960236.1、JF960235.1)设计,引物序列见(表1),由广州华大基因科技股份有限公司合成。

表1 实验中采用的引物及序列

Table 1Sequence of the primers used in this study

引物名称	序列(5′-3′)	片段长度/bp	备注
TSMVQF1	TGGGTCTGCCCCACTATACC	73	实时荧光定量检测
TSMVQR1	CAGATGGCATGTTGGGATCG		
TZNSsQF1	GTCTCCTGCTCAGCTCCATTC	77	
TZNSsQR1	TTTCTTGGAGCTGGAATCGGT		
TSVMF1	CCCAAGCTTCAACGGGAAGCAAAACGCTA	158	VIGS 载体构建
TSVMR1	CGGGATCCGCATGTTGGGATCGACCAGA		
TSNSsF1	CCCAAGCTTAGCTTCAGTCTGGGGATCAAC	150	
TSNSsF2	CGGGATCCCCCACCTTTGCAGTATAGCCA		

1.2 TSWV NSm 和 NSs 的 VIGS 载体构建

按照说明书(Trans)从接种 TSWV 并具有 TSWV 症状的烟草叶片中提取总 RNA,应用 cDNA 第1链合成试剂盒(Trans)合成 cDNA,利用 Q5 超保真 DNA 聚合酶(NEB)进行 NSm 和 NSs 序 列扩增,反应条件: 98 ℃ 预变性 40 s; 98 ℃ 变 性 10 s, 60 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个 循环, 72 ℃ 终延伸 2 min。将目的基因片段连接 到 Blunt-Zero (Trans)载体上,应用质粒提取试 剂盒(Axygen)提取质粒,采用限制性内切酶 BamHI、HindIII 同时对该质粒和 pTRV-PTV00 质 粒进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶将目的基因与 pTRV-PTV00 载体在 16 ℃ 下过夜连接, 并于 42 ℃ 热击 30 s 转化入大肠杆菌 (Escherichia. coli) DH5a 感受态细胞中。通过菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆 后,送至广州华大基因科技股份有限公司进行测 序。经序列比对分析,测序正确者则为 pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSs 重组载体。

1.3 农杆菌注射

将 重 组 质 粒 pTRV-PTV00-NSm、 pTRV-PTV00-NSs 通过电击法转入根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中,在卡那霉素(50 mg/L)和利福平 (25 mg/L)的抗性条件下筛选转化子,PCR 鉴定呈 阳性的克隆菌液即为 pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSm 根癌农杆菌菌液。

本实验采用先注射菌液后接种 TSWV 的处理 方式。用渗透缓冲液 10 mmol/LMES 和 MgCl₂ 重 悬菌液,取 pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSs 菌 重 悬 液 分 别 与 pTRV-PBINTRA(转化 pBINTRA 质粒的 GV3101 农杆菌菌株)菌重悬液 按 1:1 体积充分混勾,使用 1 mL 注射器注射侵染 于生长适合的本氏烟叶片。以注射 pTRV-PDS (转化 PDS 质粒的 GV3101 农杆菌菌株)菌液为 阳性对照,以注射 pTRV-PTV00(转化 PTV00质 粒的 GV3101 农杆菌菌株)菌液为空白对照,每 组 10 株,3 次重复。待注射 pTRV-PTV00-PDS 植株 10~15 d 后心叶开始褪绿、发白,则开始接 种 TSWV。接种 7~10 d 后,未注射任何菌液、 只接种 TSWV 的植株出现 TSWV 发病症状,采样 进行沉默效率检测。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 NSm、NSs 基因的沉 默效率

将 TSMVQ、TSNSsQ 扩增片段构建到 pMD 18-T 载体上,并将其阳性质粒连续稀释为具有 10 倍浓度梯度(10⁻¹~10⁻⁶)的质粒为实时荧光定 量 PCR 标准品,建立标准曲线。提取所采样品 总 RNA,反转录合成 cDNA,再根据 KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix(2×)试剂盒进行 qRT-PCR,反应条件:95℃预变性3分钟,95℃ 变性5秒,57℃ 退火 30秒,72℃ 延伸 30秒, 40个循环。

沉默效率 = (C-T) /C (1) 式中: C为只接种 TSWV 的植株叶片目的基因基 因拷贝数的平均值; T为注射沉默载体的植株叶 片 TSWV 目的基因拷贝数的平均值。

2 结果与分析

2.1 TSWV NSm 和 NSs 的 VIGS 载体构建结果分析

采集接种 TSWV 病毒 7~10 d 后有明显症 状的本氏烟系统叶(接种叶上一叶),提取叶片 总 RNA,并反转录为模板 cDNA,用 TSVMF1/ TSVMR1、TSVNSsF1/TSVNSsR1 特异性引物扩 增含 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切位点的 *NSm、NSs* 基因 片段。用 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 100~200 bp 处出现条带清晰且单一的特异性条带 (图 1),符合预期结果。将目的条带纯化回收 后并连接至 Blunt-Zero 载体,菌落 PCR 验证同样 获得相同大小片段,送至公司测序,经过软件 SnapGene 序列比对结果显示成功获得 158 bp NSm、 150 bp NSs 片段。将质粒双酶切验证(图 2)后 与 pTRV-PTV00载体连接,序列分析正确,获得 重组载体。通过电击法将重组质粒 pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSs 转化入 GV3101 中,经 菌落 PCR 验证条带大小正确,成功构建 TSWV 重组病毒 VIGS 载体 pTRV-PTV00-NSm、pTRV-PTV00-NSs,可继续开展沉默效率的检测。



图 1 NSm、NSs 基因片段扩增 Fig. 1 Magnification of NSm, NSs gene





 2.2 NSm、NSs 基因实时荧光定量 PCR 标准曲线 的建立

通过特异引物 TSMVQF1/TSMVQR1、TS-VNSsQF1/TSVNSsQR1扩增得到 73 bp NSm、77 bp NSs 基因片段,片段大小符合预期,纯化回收后 将目的基因片段连接到 pMD18-T上,经 Nano Drop 2000浓度测量仪测得 NSm 质粒浓度为 122.286 μg/mL、NSs 质粒浓度为 141.655 μg/mL, 分别以 10⁻²~10⁻⁶的 5 个浓度梯度标准质粒 DNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR,得到标椎曲 线。NSm 与 NSs 基因标准曲线中 Ct 值和标准质粒 浓度之间呈良好的线性关系,可用于定量分析 (图 3)。NSm 基因标准曲线方程为: Y=-3.705X+ 35.261,扩增效率为 96.162%,相关系数为 0.999; NSs 标准曲线方程为: Y=-3.70X+34.165,扩增效 率为 96.309%,相关系数为 0.999。





2.3 TSWV 基因沉默效果

TRV-PDS 作为阳性对照,起指示作用,当植株 PDS 基因沉默后,植株叶片会受到光漂白而褪绿呈现白色(图 4a),而 pTRV-PTV00 作为阴性对照植株表型则没有变化(图 4b),表示空载体对植株表型没有影响。



a. 植物注射 PDS 基因 b. 植物注射空载体

图 4 本氏烟中沉默 PDS 基因

Fig. 4 Silencing PDS gene in N. benthamiana

通过先注射载体,待阳性对照 PDS 沉默植株 褪绿呈现白色后接种 TSWV,显症后采集样品运

用实时荧光定量 PCR 检测 TSWV 的 NSm、NSs 基因绝对表达量,结果显示 NSm 基因沉默效率 为 86.70%, NSs 基因沉默效率为 92.00% (图 5)。



Fig. 5 Silencing efficiency of NSm, NSs gene

3 结论与讨论

VIGS 技术已经广泛用于多种植物的目标基因 功能分析,如病毒防御、植物信号转导等,但多 是沉默宿主植物内源基因,对于外源病原菌或病 毒则鲜见报道。TRV 是包含2条正链的 RNA 病 毒, RNA1 编码复制酶 RdRp、移动蛋白的 pTRV1, RNA2 编码外壳蛋白、2个非结构蛋白的 pTRV2, 并改造为其2个独立质粒结构(pBINTRA 和 pTRV-PTV00), pTRV1可以不依赖 pTRV2, 在植物体 内复制并系统移动^[27]。将 pTRV2 上的非结构蛋白 替换为多克隆位点可用于克隆约 2000~3000 bp 的目标基因,但有研究报道 VIGS 插入目标基因 最适长度约为 200~1300 bp^[28-29]。本研究将 TSWV NSm 的 157 bp 和 NSs 的 150 bp 插入 pTRV-PTV00 载体, 经浸润本氏烟, 成功将 TSWV 非结构蛋白 沉默。这个插入片段小于之前报道的,可能是由 于插入的是外源基因,这将更有利于片段的扩增 及减少碱基突变。

植物病毒必须克服重重细胞屏障,到达维管 组织,才能系统入侵宿主植物^[30]。目前研究发现 TSWV的*NSm、NSs*基因与病毒的系统侵染密切 相关,但机制有待进一步研究。本研究采用先注 射后接毒的方式处理本氏烟,通过实时荧光定量 PCR 检测发现沉默*NSm*基因效率为86.7%,沉默 *NSs*基因效率为92%,沉默载体的成功构建为 TSWV 致病机制的解析提供了技术手段,本研究 选择 TRV 作为 VIGS 载体,可以侵染植物分生组 织,且其引起的症状较温和,这将有利于基因沉 默表型观察及提高沉默效率。

TRV-VIGS 技术由于其宿主广泛、沉默效率

高、周期短等优点,近年来广泛应用于植物发 育、代谢物的生物合成、生物和非生物胁迫耐受 以及植物进化的各个方面,本研究也成功沉默 TSWV的非结构蛋白。选用本氏烟作为浸润 载体可保证高的转化效率。但仍可能存在沉默脱 靶基因、沉默不完全、沉默不一致等缺点,且TRV 可能改变植物的代谢或基因表达,还可能引起相 关表型改变。为解决这些问题,可以增加重复试 验,设置对照组,改良载体等。本研究通过TSWV 非结构蛋白的 VIGS 载体构建,为TSWV 非结构 蛋白在病毒致病机制等方面的解析提供基本材 料,为TSWV 的绿色防控提供有力新的路径。

TSWV 在我国多省市发生,严重影响烟草、 辣椒以及番茄等经济作物,甚至造成巨大经济损 失。本研究通过 pTRV-PTV00 载体构建 NSm、NSs 基因沉默载体,沉默效率接近 90%,为 TSWV 基因功能及致病机理的研究提供基础材料,并为 TSWV 田间绿色防控提供了技术手段。

[参考文献]

- [1] Goodin M M, Zaitlin D, Naidu R A, et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(8): 1015–1026.
- [2] Bally J, Jung H, Mortimer C, et al. The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons [J]. Annual Review of Phytopathology, 2018, 56: 405–426.
- [3] Fodor J, Kámán-Tóth E, Dankó T, et al. Description of the *Nicotiana benthamiana-Cercospora nicotianae* pathosystem [J]. Phytopathology, 2018, 108(1): 149–155.
- [4] Scholthof K B G, Adkins S, Czosnek H, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 938–954.
- [5] Poelwijk F, Kolkman J, Goldbach R. Sequence analysis of the 5' ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs [J]. Archives of Virology, 1996, 141(1): 177–184.
- [6] Adhab M, Angel C, Rodriguez A, et al. Tracing the lineage of two traits associated with the coat protein of the Tombusviridae: Silencing suppression and HR elicitation in nicotiana species [J]. Viruses, 2019, 11: 588.
- [7] Wan Y R, Hussain S, Merchant A, et al. Tomato spotted wilt *Orthotospovirus* influences the reproduction of its insect vector, western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, to facilitate transmission [J]. Pest Management Science, 2020, 76(7): 2406–2414.

- [8] Pandey S K, Nookaraju A, Fujino T, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS)-mediated functional characterization of two genes involved in lignocellulosic secondary cell wall formation [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(11): 2353–2367.
- [9] Li Y J, Liu Y T, Qi F T, et al. Establishment of virusinduced gene silencing system and functional analysis of ScbHLH17 in *Senecio cruentus* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 147: 272–279.
- [10] Kant R, Dasgupta I. Phenotyping of VIGS-mediated gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(7): 1159–1170.
- [11] Gama F, Saavedra T, Dandlen S, et al. Silencing of the FRO1 gene and its effects on iron partition in *Nicotiana benthamiana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 114: 111–118.
- [12] Agarwal A V, Singh D, Dhar Y V, et al. Virus-induced silencing of key genes leads to differential impact on withanolide biosynthesis in the medicinal plant, withania somnifera [J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(2): 262–274.
- [13] Chen X H, Duan X F, Wang S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of MYB80 gene involved in *Solanum lycopersicum* cold tolerance [J]. Protoplasma, 2019, 256(2): 409–418.
- [14] Sarde S J, Bouwmeester K, Venegas-Molina J, et al. Involvement of sweet pepper CaLOX2 in jasmonate-dependent induced defence against Western flower *Thrips* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2019, 61(10): 1085–1098.
- [15] Chandan R K, Singh A K, Patel S, et al. Silencing of tomato CTR1 provides enhanced tolerance against Tomato leaf curl virus infection [J]. Plant Signaling & Behavior, 2019, 14(3): e1565595.
- [16] Qian X, Xiang Q, Yang T, et al. Molecular co-chaperone SGT1is critical for cell-to-cell movement and systemic infection of tomato spotted wilt virus in *Nicotiana benthamiana* [J]. Viruses, 2018, 10: 647.
- [17] Lange M, Yellina A L, Orashakova S, et al. Virus-Induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems[M]//Becker A.Virus-Induced Gene Silencing: Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2013: 1-14.
- [18] Cheng C X, Gao J P, Ma N. Investigation of petal senescence by trv-mediated virus-induced gene silencing in rose [M]//Clifton N J. Plant Senescence: Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2018: 49–63.
- [19] Wang F S, Xu Y Y, Liu X N, et al. Use of TRV-mediated VIGS for functional genomics research in

Citrus [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 139(3): 609–613.

- [20] Velasquez A C, Chakravarthy S, Martin G B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. JoVE, 2009, 28: e1292.
- [21] Zhang Z, Li D W, Jin J H, et al. VIGS approach reveals the modulation of anthocyanin biosynthetic genes by CaMYB in chili pepper leaves [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 500.
- [22] Bilichak A, Kovalchuk I. Increasing a stable transformation efficiency of *Arabidopsis* by manipulating the endogenous gene expression using virus-induced gene silencing[M]//Kovalchuk I. Plant epigenetics: methods and protocols, methods in molecular biology. New York: Springer, 2017: 225–236.
- [23] 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 virusinduced gene silencing (VIGS) in wheat and maize [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 393.
- [24] Cai C, Wang X, Zhang B, et al. Tobacco rattle virus-induced gene silencing in cotton [J]. Methods Molecular Biololgy, 2019, 1902: 105–119.
- [25] Hedil M, Sterken M G, de Ronde D, et al. Analysis of *Tospovirus* NSs proteins in suppression of systemic silencing [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134517.
- [26] Feng Z, Xue F, Xu M, et al. The ER-membrane transport system is critical for intercellular trafficking of the NSm movement protein and Tomato spotted wilt tospovirus [J]. PLoS Pathogens, 2016, 12: e1005443.
- [27] Bachan S, Dinesh K S P. Tobacco rattle virus (TRV)based virus-induced gene silencing [J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 894: 83–92.
- [28] Liu E W, Page J E. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus [J]. Plant Methods, 2008, 4(1): 1–13.
- [29] Ali Z, Abul-Faraj A, Piatek M, et al. Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants [J].
 Plant Signaling & Behavior, 2015, 10(10): e1044191.
- [30] Navarro J A, Sanchez N J A, Pallas V. Chapter One -Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host [J]. Advances in Virus Research, 2019, 104: 1–64.

(责任编辑 张 坤)

