

病毒诱导的基因沉默在番茄功能基因组学中的应用进展

杨同文, 武安泉, 盛东峰, 李成伟*

(河南周口师范学院, 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南周口 466001)

摘要: 对近年来病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 技术在番茄果实发育、激素调控、植物—病原物互作、防御害虫及非生物胁迫应答相关基因功能研究方面的进展进行了综述。

关键词: 番茄; VIGS; 果实发育; 植物—病原物互作

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 03-0564-13

Applications of Virus-induced Gene Silencing in Studies on Tomato Functional Genomics

YANG Tong-wen, WU An-quan, SHENG Dong-feng, and LI Cheng-wei*

(Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: In this paper, the latest advance in research of tomato functional genes in fruit development, hormone regulation, plant-pathogen interactions, pest defenses and abiotic stress responses were reviewed.

Key words: *Solanum lycopersicum*; VIGS; fruit development; plant-pathogen interaction

番茄果实营养丰富, 产量高和适应性强, 目前世界各地广泛栽培, 在蔬菜市场中产值居第一位, 产量居第二位 (FAOSTAT, 2011; <http://faostat.fao.org/>)。不断培育高产、优质、抗病虫害、抗逆等优良性状的新品种是实现番茄持续增产的关键。相对于传统育种, 分子育种已经显示出明显的优势和巨大的潜力, 而番茄功能基因组的深入研究则是分子育种的基础。

基于植物天然抗病毒机制开发的病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是解析植物基因功能的一项新技术, 相比于图位克隆、插入突变等传统方法具有经济高效、研究周期短、不需植物转化及可以沉默基因家族等特点 (Baulcombe, 2004; Burch-Smith et al., 2004; Robertson, 2004; Scofield & Nelson, 2009; Senthil-Kumar & Mysore, 2011)。因此短短 10 多年间, 已经开发了 30 多种可用于植物 VIGS 的病毒载体, 成为研究植物功能基因组的常规工具。利用该技术在番茄中已鉴定或验证了上百种功能基因。

本文中根据国内外最新文献, 重点对 VIGS 技术在番茄果实发育、激素调控、植物—病原物互作、防御害虫及非生物胁迫应答等分子机制方面的国内外研究进展进行总结和评述。

收稿日期: 2013-11-08; 修回日期: 2014-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071807)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lichengwei166@sohu.com)

1 VIGS 及有效的番茄 VIGS 载体

1.1 VIGS 作用机制

植物在长期进化过程中形成了多种抗病毒机制, 其中转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 是植物抵御病毒在体内增殖的保守策略。VIGS 是近年来发现的一种转录后基因沉默现象, 研究表明它是植物中普遍存在的天然免疫系统, 保护植物免受病毒的侵染 (Lu et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004)。植物一旦感染病毒, 病毒复制过程中形成的双链 RNAs (dsRNAs) 或者类似双链 RNA 的结构被一种称作 DCL 的蛋白 (DICER-LIKE) 切割成 21 ~ 24 nt 的小干扰 RNAs (siRNAs)。这些 siRNAs 组装到一种 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 上, 该复合物在 siRNAs 的指导下与病毒 mRNA 互补配对, 以序列特异性的方式对靶标进行剪切 (Baulcombe, 2004)。

根据病毒诱导的沉默机制, 通过基因工程手段将插入多克隆位点的病毒基因组 cDNA 重组到植物表达载体, 得到具有侵染性的 VIGS 病毒载体。当将植物目标基因片段插入该载体后侵染植物, 植物细胞同样会启动 PTGS 程序, 特异性地诱导植物内源靶基因的沉默 (Becker & Lange, 2010), 这时植物会出现靶基因功能丧失或表达水平下降的表型, 通过表型变异进行靶基因功能的分析和鉴定。由于 VIGS 是利用重组病毒对植物基因进行的暂时沉默, 因此一般有效的沉默期在 1 个月左右, 此后将出现沉默的衰减和表型的恢复 (Ratcliff et al., 2001; Ryu et al., 2004)。

1.2 番茄 VIGS 载体的开发

依据 VIGS 作用机制, 很多病毒 (包括 RNA 病毒、DNA 病毒和病毒卫星 DNA) 被改造成 VIGS 载体并有效应用到番茄上 (Becker & Lange, 2010)。如较早开发的马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 载体被成功用于番茄果实发育研究 (Manning et al., 2006; Lin et al., 2008), 但该载体使用中需要先进行体外转录, 然后将 RNA 注射接种果实。基于烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 的 VIGS 载体因其具有较高的沉默效率、温和的病毒症状、较高的沉默持续性及理想的重复性等优点, 目前已成为植物中应用最广的病毒 VIGS 载体 (Ratcliff et al., 2001; Senthil-Kumar & Mysore, 2011)。随着 TRV 载体各种改良形式的开发, 以及接种方式的多样化 (农杆菌注射、农杆菌渗透、农杆菌灌根等), 使 TRV 介导的 VIGS 在番茄中的应用更加灵活高效 (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002a, 2002b; Ryu et al., 2004; Valentine et al., 2004)。苹果潜隐球形病毒 (*Apple latent spherical virus*, ALSV) 也被构建成可靠、高效的 VIGS 载体, 并成功应用到番茄基因的沉默研究中 (Igarashi et al., 2009), ALSV VIGS 载体的优点是在番茄上不产生病毒症状。

一些 DNA 病毒载体也相继开发出来用于番茄基因功能研究, 例如来自甜菜曲顶病毒 (*Beet curly top virus*, BCTV) 的 VIGS 载体和来自番茄曲叶病毒 (*Tomato leaf curl virus*, ToLCV) 的 VIGS 载体 (Golenberg et al., 2009; Pandey et al., 2009)。通过改造中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV) 和烟草曲茎病毒 (*Tobacco curly shoot virus*, TbCSV) 的卫星 DNA, 分别开发出 TYLCCNV (DNA β)-VIGS 和 TbCSV (DNA1)-VIGS 病毒卫星沉默载体, 并证明能高效用于番茄基因的沉默中 (Tao & Zhou, 2004; Cai et al., 2007; Huang et al., 2009)。DNA β -VIGS 载体有以下优点: 番茄不同生育期接种均不影响基因沉默的启动, 沉默对培养温度不敏感, 植株不表现病毒症状等。表 1 列出了目前应用于番茄上的有效的病毒 VIGS 载体及接种方法。

表 1 番茄 VIGS 中使用的载体及接种方式

Table 1 List of VIGS vectors used in tomato and inoculation methods

VIGS 病毒载体 VIGS vector	病毒种类 Virus species	沉默器官 Silenced organs	接种方式 Inoculation methods	参考文献 Reference
RNA 病毒 RNA Virus TRV-VIGS 载体 TRV-VIGS vector	烟草脆裂病毒 <i>Tobacco rattle virus</i> , TRV	叶、茎、花和果实 Leaf, stem, flower and fruit	农杆菌叶片渗透、果实注射、 灌根 Agro-infiltration, Agro-injection, Agro-drenching	He et al., 2004; 杨迎伍 等, 2008; Chen et al., 2009; Ryu et al., 2004; 于国红 等, 2012
ALSV-VIGS 载体 ALSV-VIGS vector	苹果潜隐球状病毒 <i>Apple latent spherical virus</i> , ALSV	叶 Leaf	病毒感染组织汁液接种 Virus sap inoculation	Igarashi et al., 2009
PVX-VIGS 载体 PVX-VIGS vector	马铃薯 X 病毒 <i>Potato virus X</i> , PVX	果实 Fruit	体外转录 RNA 注射果实 RNA-injection	Lin et al., 2008; Manning et al., 2006
DNA 病毒 DNA Virus BCTV-VIGS 载体 BCTV-VIGS vector	甜菜曲顶病毒 <i>Beet curly top virus</i> , BCTV	叶 Leaf	农杆菌叶片渗透 Agro-infiltration	Golenberg et al., 2009
ToLCV-VIGS 载体 ToLCV-VIGS vector	番茄曲叶病毒 <i>Tomato leaf curl virus</i> , ToLCV	叶 Leaf	农杆菌叶片渗透 Agro-infiltration	Pandey et al., 2009
卫星 DNA Satellite DNA TYLCCNV (DNA β)- VIGS 载体 TYLCCNV (DNA β)- VIGS vector	中国番茄黄化曲叶病毒 <i>Tomato yellow leaf curl China</i> <i>virus</i> , TYLCCNV	叶、茎、果实和根 Leaf, stem, fruit and root	农杆菌叶片渗透 Agro-infiltration	Tao & Zhou 2004; Cai et al., 2007; He et al., 2008
TbCSV (DNA1)- VIGS 载体 TbCSV (DNA1)- VIGS vector	烟草曲茎病毒 <i>Tobacco curly shoot virus</i> , TbCSV	叶 Leaf	农杆菌叶片渗透 Agro-infiltration inoculation	Huang et al., 2009

2 VIGS 在番茄功能基因组学研究中的应用

应用 VIGS 技术在番茄中鉴定的基因功能涉及生长发育、代谢调控、生物防御及非生物胁迫应答等诸多方面 (表 2)。

2.1 VIGS 在番茄果实成熟调控研究中的应用

利用 VIGS 技术, 人们已经系统研究了番茄果实成熟过程中乙烯合成途径中一些关键调控因子的功能。例如在番茄中沉默 HD-Zip 同源异形盒基因 *LeHB-1*, 显著降低了其下游调控基因 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, ACC) 氧化酶基因的表达。番茄 ACC 氧化酶 (LeACO1) 是乙烯合成途径中的重要成员, 其表达下调阻止了番茄果实的成熟 (Lin et al., 2008)。番茄 F-box 基因 *SIEBF* 是乙烯信号途径中的负调控子, 利用 VIGS 在番茄中同时沉默基因 *SIEBF* 和 *SIEBF2*, 沉默植株出现败育、生长迟缓、加快衰老和果实早熟等一系列表型 (Yang et al., 2010)。番茄 *LeEIN2* 基因产物控制着果实成熟的过程, 因此推测它在乙烯信号途径中起着关键的作用。Fu 等 (2005) 用 VIGS 技术证实了该假设, 发现 *LeEIN2* 基因的沉默影响果实的成熟, 导致在沉默番茄中大部分果肉呈现绿色。与对照红色果肉相比, 绿色果肉中 *LeEIN2* 基因转录子显著降低 (Fu et al., 2005)。此前发现乙烯合成关键酶 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的表达由一种 MADS-box 转录因子所调控, 该转录因子被称作成熟抑制子 (Ripening inhibitor, RIN)。最近, 通过 VIGS 技术揭示了番茄果实成熟过程中 *LeRIN* 的功能, *LeRIN* 基因的沉默抑制了其下游靶基因 *LeACS2*、*LeACS4* 和 *LeACO1* 的表达, 进而阻止了果实的成熟 (Li et al., 2011a, 2011b)。

番茄果实颜色由类胡萝卜素、类黄酮等含量决定，沉默 MYB 转录因子 *SIMYB12* 基因，造成果实中一种类黄酮（柚皮素查尔酮）含量减少，从而产生粉红色的番茄果实（Ballester et al., 2010）。番茄果实中番茄红素、 β -胡萝卜素和维生素 C 含量丰富，但维生素 E 却很低。芦亮亮等（2011）将生育酚环化酶（Tocopherol cyclase E1）基因片段与 pTRV2-PDS 重组构建了 pTRV2-PDS-E1 载体，经农杆菌介导侵染番茄，实现了对多个基因的同时沉默，为鉴定维生素 E 合成相关基因及改良番茄品质奠定了基础。为了研究番茄果实成熟过程中多基因的精细调控，王晓光等（2009）利用 TRV 沉默载体构建了破色期番茄果实均一化 cDNA 沉默文库，为高通量研究基因功能建立了高效的筛选模型。

最近，Fernandez-Moreno 等（2013）利用 TRV 载体开发出一种快速分析果实基因功能的视觉可追踪系统，称为“Fruit-VIGS”。该系统中，转基因紫色番茄中花青素的积累为果实特有基因的沉默提供了理想背景。在转基因株系 Del/Ros1 中，番茄果实特异启动子 E8 使金鱼草花青素合成调控基因 *Delila* (*Del*) 和 *Roseal* (*Ros1*) 异位表达，从而伴随果实成熟积累花青素。*Del* 和 *Ros1* 基因的 VIGS 沉默产生容易辨别的颜色改变。将含有 pTRV1 和 pTRV2 载体的农杆菌直接注射进番茄果实即能实现基因沉默，其中 pTRV2 中含有 *Del* 和 *Ros1* 基因编码区的片段 (*DR module*)。报告基因 *Del/Ros1* 和靶标基因 (*GOI*, Gene of interest) 的共沉默便于准确判断沉默发生的果实部位。通过比较 *DR* 和 *GOI* 共沉默和仅 *DR* 沉默的番茄相应部位进行 *GOI* 基因功能的分析，该研究开发的 Gateway 载体 (pTRV2-GW) 能同时插入 *GOIs* 和 *DR* 基因，特别适合研究番茄果实成熟过程中各种代谢基因的功能，因为这些 *GOIs* 基因自身的沉默并不能产生可见的表型 (Fernandez-Moreno et al., 2013)。

番茄 VIGS 系统也被用于分析番茄叶片脱落相关基因的功能。番茄聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonases, TAPGs) 基因的沉默导致该基因转录本丰度显著降低，延迟了叶柄的脱落同时提高了脱落带的断裂强度 (Jiang et al., 2008)。

表 2 利用 VIGS 研究的番茄基因及其表型

Table 2 List of genes silenced by virus induced gene silencing and the phenotype observed in tomato

靶基因 Target gene	VIGS 载体 VIGS vector	功能 Function	沉默表型 Silencing phenotype	参考文献 Reference
HB-1	PVX (<i>Potato virus X</i>)	乙烯生物合成 Ethylene biosynthesis	果实延迟成熟 Delay ripening of tomato	Lin et al., 2008
RIN, ACS2, ACS4, ACO1	TRV (<i>Tobacco rattle virus</i>)	乙烯生物合成 Ethylene biosynthesis	抑制乙烯合成和果实成熟 Inhibit ethylene biosynthesis and ripening	Li et al., 2011a, 2011b; Mantelin et al., 2013
EIN2	TRV	乙烯生物合成 Ethylene biosynthesis	抑制成熟 Inhibit ripening	Fu et al., 2005
GPS	TRV	赤霉素生物合成 Gibberellin biosynthesis	植物矮化 Dwarfed plants	van Schie et al., 2007
SPL-CNR	PVX	功能未鉴定 Function unidentified	抑制成熟 Inhibit ripening	Manning et al., 2006
TAGP1	TRV	叶柄脱落 Petiole abscission	延迟脱落 Delayed abscission	Jiang et al., 2008
MYB12	TRV	类黄酮合成调控 Flavonoid biosynthesis	粉色果实 Pink tomato	Ballester et al., 2010
Del/Ros1	TRV	花青素合成调控 Anthocyanin biosynthesis	果实颜色改变 Changed fruit color	Fernandez-Moreno et al., 2013
TC	TRV	维生素 E 合成 Vitamin E biosynthesis	维生素 E 合成减弱 Decreased vitamin E biosynthesis	芦亮亮 等, 2011
KAS I	TRV	支链脂肪酸途径 Branched-chain fatty acids pathway	影响支链脂肪酸合成 Negatively affect Branched-chain fatty acids biosynthesis	Slocombe et al., 2008

续表 2

靶基因 Target gene	VIGS 载体 VIGS vector	功能 Function	沉默表型 Silencing phenotype	参考文献 Reference
HT1	TRV	病毒抗性 Virus resistance	病毒扩散和细胞坏死加重 Enhanced virus spread and necrosis	Eybishtz et al., 2010
Permease1-like protein	TRV	病毒抗性 Virus resistance	TYLCV 易感性增强 Susceptibility to TYLCV	Eybishtz et al., 2009
SGT1	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	病症减轻 Reduction of disease-associated symptoms	Uppalapati et al., 2011; Kud et al., 2013
MKK2, MPK2	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	增强易感性 Enhanced susceptibility	Melech-Bonfil & Sessa, 2011
FTR	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	增强抗病性 Enhanced disease resistance	Lim et al., 2010
APR134	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	增强易感性 Enhanced susceptibility	Chiasson et al., 2005
ALC1	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	产生超敏反应 Produced a hypersensitive phenotype	Wangdi et al., 2010
GRAS6	TRV	细菌抗性和损伤应答 Bacterial resistance and mechanical stress response	抗菌性增强 Improved bacterial resistance	Mayrose et al., 2006
MAPK, NPR1, TGA	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	抗菌性增强 Improved bacterial resistance	Ekengren et al., 2003
ERF5, RAV2	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	抗菌性减弱 Attenuates the defense against <i>ralstonia solanacearum</i>	Li et al., 2011a, 2011b
ACO1, EIN2, ERF3, NPR1, TGA2.2, TGA1a, MKK2, MPK1, MPK3	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	茎基部细菌繁殖增强 Increase in bacterial proliferation in stem-bases	Chen et al., 2009
Prx	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	DC3000 应答中组织的加速坏死 Accelerated necrosis in response to DC3000	Ishiga et al., 2012
PP2Ac1	TRV	细菌抗性 Bacterial resistance	防御应答激活及局部细胞坏死 Activation of plant defense responses and localized cell death	He et al., 2004
NRC1	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	抑制超敏反应 Suppression of the HR	Gabriels et al., 2007
ACRE276	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	易感性增强 Enhanced susceptibility	Yang et al., 2006
PI-PLC	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	抗性改变 Altered resistance	Vossen et al., 2010
NTRC	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	病菌应答的坏死性细胞死亡加速 Accelerated necrotic cell death in response to <i>S. sclerotiorum</i>	Ishiga et al., 2012
CITRX	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	超敏反应加强 Increase hypersensitive response	Rivas et al., 2004
EDS1, NDR1, MEK2, ACIF1	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	Ve1 的正调控 Positive regulators of in tomato	Fradin et al., 2009
RGLIP-1, RGLIP-2	TRV	真菌抗性 Fungal resistance	抑制超敏反应 Suppression of the HR	刘庆 等, 2006
AttAGP	TRV	抗病 Disease resistance	降低菟丝子的吸附能力 Decreased attachment capability of <i>Cuscuta reflexa</i>	Albert et al., 2006
MPK1, MPK2, MPK3	TRV	抗病 Disease resistance	降低超敏反应 Reduced HR	Li et al., 2006
SERK1	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	降低超敏反应 Reduced HR	Mantelin et al., 2011

续表 2

靶基因 Target gene	VIGS 载体 VIGS vector	功能 Function	沉默表型 Silencing phenotype	参考文献 Reference
NPR1	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	负面影响抗蚜性 Negatively affect aphid resistance	Avila et al., 2012
WRKY72a WRKY72 b	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	Mi-1 介导抗性和基础抗性减弱 Reduction of Mi-1-mediated resistance and basal defense against nematodes and potato aphids	Bhattarai et al., 2010
Hsp90	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	Mi-1 介导线虫和蚜虫抗性减弱 Diminished Mi-1-mediated aphid and nematode resistance	Bhattarai et al., 2007
WRKY70	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	Mi-1 介导线虫和蚜虫抗性减弱 Attenuated Mi-1-mediated resistance against aphid and nematodes	Atamian et al., 2012
MPK1, MPK2	TRV	抗虫 Insect/Pest resistance	昆虫抗性减弱 Reduced resistance to herbivorous insects	Kandoth et al., 2007
BRI1	TRV	损伤信号 Wound signaling	影响油菜素内酯的感受 Impaired in brassinosteroid perception	Malinowski et al., 2009
GSH1, GSH2, GR1	TRV	非生物胁迫 Abiotic stress	谷胱甘肽含量及其还原型与氧化比率降低 Decreased glutathione content and the ratio of GSH to GSSG	Yu et al., 2013
DREB2	TRV	非生物胁迫 Abiotic stress	抗旱性减弱 Decreased drought stress	于国红 等, 2012
Lea4	TRV	非生物胁迫 Abiotic stress	水分胁迫加重 Enhanced susceptibility to moisture stress	Senthil-Kumar & Udayakumar, 2006
GRX1	TYLCCNV (Tomato yellow leaf curl China virus)	非生物胁迫 Abiotic stress	减弱干旱和盐胁迫 Decrease drought stress and salt stress	Guo et al., 2010

2.2 VIGS 用于研究番茄生物胁迫应答机制

2.2.1 细菌病害抗性相关基因功能的研究

番茄细菌性斑点病的病原菌是丁香假单胞菌番茄株系 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, Pst DC3000)。此前人们已经利用 VIGS 技术研究了番茄抗病基因 *Pto* 介导的抗性途径中 *NPR1*、*TGA*、*TGA2.2*、*TGA1a* 等多种基因的功能 (Ekengren et al., 2003; Chen et al., 2009)。最近利用 VIGS 快速鉴定工具结合传统突变筛选技术, 发现并鉴定了 *P. syringae* 致病机制中冠菌素 (Coronatine, COR) 信号传导途径一些新成员 (Wangdi et al., 2010; Uppalapati et al., 2011; Ishiga et al., 2012; Kud et al., 2013)。

冠菌素是一种茉莉酸—异亮氨酸 (JA-isoleucine) 类似物, 是多种细菌产生的效应子。丁香假单胞菌侵染的番茄产生典型的叶片坏死斑点及其周围的缺绿症状, 其中缺绿症状主要由 COR 诱导产生 (Uppalapati et al., 2011)。番茄 *SIALCI* (Altered COR response, ALC) 基因与叶绿体类囊体形成相关, *SIALCI* 基因沉默植株的致病性试验表明, 丁香假单胞菌加速诱导了番茄叶片超敏反应/坏死样症状的出现 (Wangdi et al., 2010)。*SGT1* (Suppressor of G2 allele of *skp1*) 在番茄中的沉默缓解了细胞坏死和缺绿症状, 说明 *SGT1* 是番茄 COR/JA 介导信号途径中的重要成员, 同时也说明 COR 诱导的缺绿症与细胞坏死之间存在密切联系 (Uppalapati et al., 2011)。在另一项 TRV 病毒载体沉默

SGT1 基因的研究中,对番茄沉默株的丁香假单胞菌接种试验则显示 *Prf* 抗性蛋白的积累及其介导的抗性都需要 *SGT1* 的参与 (Kud et al., 2013)。类似的研究表明,番茄 NTRC (NADPH-dependent thioredoxin reductase C) 和过氧化物酶 (Peroxioredoxin) 在丁香假单胞菌诱导的叶片局部失绿和细胞死亡,以及在 COR 诱导的叶绿体活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 促进细胞死亡过程中作为负调控子发挥作用 (Ishiga et al., 2012)。另外,在番茄中用 VIGS 研究了铁氧还蛋白的催化亚基硫氧还蛋白还原酶基因 (*SIFTR*) 的功能,在沉默植株中诱导了超敏反应 (Hypersensitive response, HR),激发防御相关基因的表达,从而改善了植株对丁香假单胞菌的抗性 (Lim et al., 2010)。

植物防止病菌攻击需要通过复杂的信号级联传导和一系列效应基因激活转录。最近 Melech-Bonfil 和 Sessa (2011) 采用 TRV-VIGS 研究了 MAPK (Mitogen activated protein kinase) 信号级联在番茄抵御野油菜黄单胞菌辣椒致病变种 *Xcv* (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 病害中的作用。在超表达拟南芥 *CBF1* (*AtCBF1*) 的转基因番茄中沉默两个转录因子基因 *SlERF5* (ethylene responsive factor) 和 *SlRAV2* (Related-to-ABI3/VP1), 沉默植株对青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 增加了易感性,使人们重新认识植物 AP2/EREBP 介导的逆境防御途径 (Li et al., 2011a, 2011b)。另一项研究指出乙烯、水杨酸和 MAPK 联合防御信号途径参与了茄科雷尔氏菌感染的抗性反应 (Chen et al., 2009)。

2.2.2 真菌病害抗性相关基因功能的研究

VIGS 技术在番茄—叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*, *Cf*) 互作研究中取得了重要进展,鉴定了一系列抗病基因 (Gabriels et al., 2006)。番茄抗叶霉病菌基因识别该菌无毒因子,产生超敏反应介导的抗性。利用 VIGS 沉默抗性类似基因 *NRC1* (NB-LRR protein required for HR-associated cell death 1), 抑制了对 *Cf-4/Avr4* 激发的超敏反应,说明该基因为 *Cf* 介导的抗性信号所必需,在细胞死亡信号途径中发挥作用 (Gabriels et al., 2007)。同样,TRV 载体介导番茄 *ACRE276* (*Avr9/Cf-9* Rapidly Elicited) 基因的沉默证实 *ACRE276* 是番茄 *Cf-9* 介导真菌抗性的必需因子 (Yang et al., 2006)。利用 VIGS 技术也鉴定了一些 *Cf* 免疫应答中 PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase) 家族基因的功能,*SIPLC4* 的沉默减弱 *Avr4/Cf-4* 诱导的超敏反应,而 *SIPLC6* 的沉默对超敏反应无影响,但为其它病菌抗性所必需 (Vossen et al., 2010)。刘庆等 (2006) 利用 VIGS 技术对两个抗性基因互作蛋白 (Resistance Gene Like Interacting Protein) *RGLIP-1* 和 *RGLIP-2* 基因进行了功能分析。结果表明这两个互作蛋白参与了与番茄抗叶霉病相关的超敏反应。此外,VIGS 技术也证明 *CITRX* 是 *Cf-9/Avr9* 诱导超敏反应的负调控因子 (Rivas et al., 2004),而在 *Cf-4/Avr4* 诱导的超敏反应中,*LeMPK1*, *LeMPK2* 和 *LeMPK3* 能够被特异性激活并有可能参与其中的信号转导过程 (Stulemeijer et al., 2007)。

另一种番茄真菌病是由土传真菌引起的维管萎蔫病,抗病基因位点 *Ve* 编码细胞表面受体蛋白,调控着对黄萎病菌 *Verticillium* 的抗性。为了研究这些细胞表面受体蛋白在 *Verticillium* 抗性中的功能,Fradin 等 (2009) 利用 VIGS 技术揭示了 *Ve1* 下游信号途径需要 *EDS1* (Enhanced Disease Susceptibility1)、*NDR1* (Nonrace-specific Disease Resistance1)、*MEK2* (MAP kinase kinase)、*NRC1* (NB-LRR protein) 和 *Acif1* (F-box protein) 的参与。VIGS 也用于研究番茄晚疫病抗性分子机制。以易感品种 (M82) 及抗性近等基因系 (IL6-2) 作为材料,利用 TRV 病毒载体分别沉默了 *R* 基因 (*37O19*) 和过氧化物酶体膜蛋白基因 (*35P7*)。结果发现,基因沉默的 IL6-2 株系抗性明显减弱,而敏感品种 M82 番茄抗性减弱不显著 (Cai et al., 2013)。

2.2.3 病毒病害抗性相关基因功能的研究

Eybishtz 等 (2009) 首次将 VIGS 技术成功应用于植物—病毒互作研究,在番茄中沉默一类通透酶蛋白 (Permease1-like protein) 基因,发现接种病毒后原本抗病的植株体内病毒含量呈指数

增加, 植株对番茄黄化曲叶病毒的抗性丧失, 推测该基因可能与病毒直接入侵有关。另一项由 TRV 介导的 VIGS 研究揭示了己糖转运蛋白 (Hexose transporter, HT) 基因 *LeHT1* 具有提高番茄对黄化曲叶病毒抗性的功能。*LeHT1* 基因沉默导致植株病毒传输和细胞坏死症状显著加重 (Eybishtz et al., 2010), 推测 *LeHT1* 基因的表达与抑制病毒积累和系统性移动有关, 同时提示植物具有多个层次的防御机制。最近, Czosnek 等 (2013) 利用 TRV-VIGS 系统筛选出一批参与番茄黄化曲叶病毒复合感染并发挥抗性作用的宿主基因。

2.2.4 昆虫与线虫抗性相关基因功能的研究

目前通过 VIGS 已经发现一批在抗虫害中有着重要功能的基因。*Mi-1* 是番茄中的 R 基因, 编码一个核苷酸结合及富亮氨酸重复区域为特征的抗性蛋白, 介导番茄对根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和马铃薯蚜虫 (*Macrosiphum euphorbiae*) 的抗性。Li 等 (2006) 通过 VIGS 沉默手段对 *Mi-1* 介导的蚜虫抗性 MAPK 级联中 *LeMPK1*, *LeMPK2*, *LeMPK3* 的功能进行了鉴定。番茄中热激蛋白 HSP90-1 基因的沉默导致 *Mi-1* 介导的蚜虫和线虫抗性的减弱 (Bhattacharai et al., 2007)。应用 TRV 载体介导的 VIGS, 两个番茄转录因子 WRKY72 (a, b) 在对线虫和蚜虫抗性的基础防御功能也得到了阐明 (Bhattacharai et al., 2010)。最近采用类似的方法鉴定了番茄体细胞胚胎发生受体激酶 (Tomato somatic embryogenesis receptor kinase 1, SERK1) 基因 *SISERK1* 在 *Mi-1* 介导的蚜虫抗性中的功能 (Mantelin et al., 2011)。Mantelin 等 (2013) 利用 VIGS 研究了番茄南方根结线虫 (*M. incognita*) 抗性中乙烯信号途径相关基因的功能, 发现 *Mi-1* 介导的南方根结线虫的抗性可能不依赖乙烯, 而是依赖乙烯受体, 提出 ETR3 在根结线虫基础抗性中的重要作用。

VIGS 研究发现, 番茄 MPK1 和 MPK2 在系统素原 (Prosystemin) 介导的烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 叶食抗性中在 JA 合成的上游发挥调控作用, 二者对诱导损伤应答基因的表达以防御草食性昆虫至关重要 (Kandath et al., 2007)。研究表明, 芸薹素受体 BRI1 (Brassinosteroid receptor, BR) 与细胞表面受体样激酶 (cell surface receptor-like kinase, SR) SR160 能接受和感知系统素信号。有研究指出 SIBRI1 蛋白存在系统素结合位点, 但不属于生理系统素受体 (Malinowski et al., 2009)。利用 VIGS 技术在超表达系统素原的转基因番茄中沉默了 *SIBRI1* 基因, 结果证实该基因的沉默影响到发育 BR 信号, 而不影响系统素原诱导的防御蛋白合成。

很多茄科植物表面都有分泌组织或腺毛, 其产生的分泌物在植物病虫害防御中起重要作用。对富含腺毛的潘那利番茄 (*S. pennellii*) 进行的反向遗传学研究发现了合成酰基糖和支链脂肪酸等腺毛分泌物的基因, VIGS 介导的 β -酮脂酰-ACP 合酶 I (KAS I) 基因沉默的研究揭示脂肪酸合成酶复合物在腺毛代谢物支链脂肪酸合成中的作用 (Slocombe et al., 2008)。

2.3 VIGS 对番茄非生物胁迫应答相关基因功能的研究

在沉默胚胎发育晚期丰富蛋白基因 *LEA4* (Late embryogenesis abundant) 同源基因的番茄中, 中等水分胁迫导致植株较低的细胞活性和较高的自由基水平, 说明沉默植株对氧化胁迫敏感性增加; 缺水胁迫时, 沉默番茄植株 *LEA4* 的转录下降并出现萎蔫表型, 但其它已知胁迫调控基因, 如抗坏血酸过氧化物酶基因 *APX* (Ascorbate peroxidase) 及早期光诱导蛋白基因 *ELIP* (Early light-induced protein) 并未受到影响 (Senthil-Kumar & Udayakumar, 2006)。另外一项研究表明, VIGS 介导的番茄谷氧还蛋白 (Glutaredoxin, SIGRX1) 基因的沉默直接降低了植株的耐旱性和耐盐性 (Guo et al., 2010)。于国红等 (2012) 利用 TRV 病毒载体沉默了番茄中的 *DREB2* 基因, Real-time qPCR 表明内源 *DREB2* 基因表达量明显降低, 生理指标显示干旱条件下沉默植株脯氨酸和可溶性糖水平低于对照株, 而丙二醛水平则相反。

最近, Yu 等 (2013) 用 VIGS 研究了番茄谷胱甘肽的合成和再生在百菌清 (Chlorothalonil, CHT)

代谢中的作用。用 CHT 处理 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -Glutamylcysteine synthetase, GSH1) 基因、谷胱甘肽合成酶 (Glutathione synthetase, GSH2) 基因和谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR1) 基因沉默的植株, 发现谷胱甘肽及还原性谷胱甘肽的含量显著降低, 而番茄组织 CHT 残留增多, 表明谷胱甘肽不仅可作为百菌清的结合底物, 还通过调节细胞内氧化还原的动态平衡参与番茄中农药杀菌剂的代谢调控。

3 问题与展望

虽然 VIGS 技术在鉴定番茄基因功能方面显示出巨大潜力, 但该体系也存在功能敲除不彻底、持续性差、沉默不均一、脱靶沉默 (off target silence) 及表型难于辨识等缺陷。对 VIGS 体系不断地改良与优化在一定程度上能解决上述问题。例如 Gateway、人工 miRNA、“Fruit-VIGS”等 VIGS 载体的开发与应用提高了载体沉默效率, 扩大了 VIGS 的应用领域 (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002a, 2002b; Tang et al., 2010; Fernandez-Moreno et al., 2013)。利用现有核酸数据库及相关软件寻找特异序列, 可以大大提高目标基因沉默的准确度, 避免脱靶效应。目前番茄 VIGS 研究中存在一些问题, 严重制约着番茄 VIGS 沉默体系的进一步优化。例如, 病毒诱导的 PTGS 沉默的引发、沉默信号及传导、沉默衰减等机制的研究一直是薄弱环节; 另一方面对外界条件, 如光照、温度、化学因子等如何影响番茄沉默效率还缺乏系统研究。因此, 深入揭示 VIGS 的分子机制, 挖掘沉默促进因子和优化沉默条件是未来该领域研究的重要方面。

番茄是果实发育研究的模式植物, 视觉上可跟踪 VIGS 系统的开发 (Quadrana et al., 2011) 及离体果实接种技术的应用 (Romero et al., 2011), 为番茄果实细胞壁消失, 乙烯产生及成熟相关基因功能的研究提供了有效工具。通过注射或喷洒接种载体沉默代谢相关基因, VIGS 可用于番茄采后生理代谢的调节, 实现非转基因条件下的商品性状改良, 比如延长果实货架期等。

VIGS 另一个重要研究方向是改善沉默的持续性, 目前番茄中已开发出非整合可持续传代的 VIGS 技术体系 (Senthil-Kumar & Mysore, 2011)。通过该技术体系一方面能在非遗传转化条件下鉴定各发育阶段更广泛基因的功能, 另一方面在番茄 PTGS 分子育种中也具诱人的前景。番茄基因组测序的完成 (The Tomato Genome Consortium, 2012), 为 VIGS 技术在番茄功能基因组中的应用提供更广阔的平台, VIGS 与基因芯片等其它高通量筛选技术的结合将极大提高番茄基因功能解析效率。

References

- Albert M, Belastegui-Macadam X, Kaldenhoff R. 2006. An attack of the plant parasite cuscutea reflexa induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. *The Plant Journal*, 48 (4): 54 – 56.
- Atamian H S, Eulgem T, Kaloshian I. 2012. SIWRKY70 is required for Mi-1-mediated resistance to aphids and nematodes in tomato. *Planta*, 235 (2): 299 – 309.
- Avila C A, Arevalo-Soliz L M, Jia L, Navarre D A, Chen Z, Howe G A, Meng Q W, Smith J E, Goggin F L. 2012. Loss of function of FATTY ACID DESATURASE 7 in tomato enhances basal aphid resistance in a salicylate-dependent manner. *Plant Physiology*, 158 (4): 2028 – 2041.
- Ballester A R, Molthoff J, de Vos R, Hekkert B L, Orzaez D, Fernández-Moreno J P, Tripodi P, Grandillo S, Martin C, Heldens J, Ykema M, Granell A, Bovy A. 2010. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: Dereglated expression of the gene encoding transcription factor *SIMYB12* leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiology*, 152 (1): 71 – 84.
- Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431 (7006): 356 – 363.
- Becker A, Lange M. 2010. VIGS-genomics goes functional. *Trends Plant Science*, 15 (1): 1 – 4.

- Bhattacharai K K, Atamian H S, Kaloshian I, Eulgem T. 2010. WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *The Plant Journal*, 63 (2): 229 – 240.
- Bhattacharai K K, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar S P, Kaloshian I. 2007. The Mi-1-mediated pest resistance requires *Hsp90* and *Sgt1*. *Plant Physiology*, 144 (1): 312 – 323.
- Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, Dinesh-Kumar S P. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39 (2): 734 – 746.
- Cai G, Restrepo S, Myers K, Zuluaga P, Danies G, Smart C, Fry W. 2013. Gene profiling in partially resistant and susceptible near-isogenic tomatoes in response to late blight in the field. *Molecular Plant Pathology*, 14 (2): 171 – 184.
- Cai X Z, Wang C C, Xu Y P, Xu Q F, Zheng Z, Zhou X P. 2007. Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Research*, 125 (2): 169 – 175.
- Chen Y Y, Lin Y M, Chao T C, Wang J F, Liu A C, Ho F I, Cheng C P. 2009. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen- activated protein kinase related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136 (3): 324 – 335.
- Chiasson D, Ekengren S K, Martin G B, Dobney S L, Snedden W A. 2005. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Molecular Biology*, 58 (6): 887 – 897.
- Czosnek H, Eybishtz A, Sade D, Gorovits R, Sobol I, Bejarano E, Rosas-Díaz T, Lozano-Durán R. 2013. Discovering host genes involved in the infection by the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* complex and in the establishment of resistance to the virus using *Tobacco Rattle Virus*-based post transcriptional gene silencing. *Viruses*, 5 (3): 998 – 1022.
- Ekengren S K, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P, Martin G B. 2003. Two MAPK cascades, *NPR1*, and *TGA* transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal*, 36 (6): 905 – 917.
- Eybishtz A, Peretz Y, Sade D, Akad F, Czosnek H. 2009. Silencing of a single gene in tomato plants resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* renders them susceptible to the virus. *Plant Molecular Biology*, 71 (1 – 2): 157 – 171.
- Eybishtz A, Peretz Y, Sade D, Gorovits R, Czosnek H. 2010. Tomato yellow leaf curl virus infection of a resistant tomato line with a silenced sucrose transporter gene *LeHT1* results in inhibition of growth, enhanced virus spread, and necrosis. *Planta*, 231 (3): 537 – 548.
- Fernandez-Moreno J P, Orzaez D, Granell A. 2013. VIGS: A tool to study fruit development in *Solanum lycopersicum*. *Methods in Molecular Biology*, 975: 183 – 196.
- Fradin E F, Zhang Z, Juarez Ayala J C, Castroverde C D, Nazar R N, Robb J, Liu C M, Thomma B P. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. *Plant Physiology*, 150 (1): 320 – 332.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Jiang W B, Luo Y B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant Journal*, 43 (2): 299 – 308.
- Gabriels S H, Takken F L, Vossen J H. 2006. cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interacts*, 19 (6): 567 – 576.
- Gabriels S H, Vossen J H, Ekengren S K, van Ooijen G, Abd-El-Halim A M, van den Berg G C, Rainey D Y, Martin G B, Takken F L, de Wit P J, Joosten M H. 2007. An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. *The Plant Journal*, 50 (1): 14 – 28.
- Golenberg E M, Sather D N, Hancock L C. 2009. Development of a gene silencing DNA vector derived from a broad host range geminivirus. *Plant Methods*, 5: 9.
- Guo Y, Huang C, Xie Y, Song F, Zhou X. 2010. A tomato glutaredoxin gene *SIGRX1* regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses. *Planta*, 232 (6): 1499 – 1509.
- He X, Anderson J C, del Pozo O, Gu Y Q, Tang X, Martin G B. 2004. Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death. *The Plant Journal*, 38 (4): 563 – 577.
- He X, Jin C, Li G, You G, Zhou X, Zheng S J. 2008. Use of the modified viral satellite DNA vector to silence mineral nutrition related genes in plants: Silencing of the tomato ferric chelate reductase gene, *FRO1*, as an example. *Science in China: Series C*, 51 (5): 402 – 409.
- Huang C, Xie Y, Zhou X. 2009. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnology Journal*, 7 (3): 254 – 265.

- Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, Takahashi Y, Sugawara E, Tamura A, Yaegashi H, Yamagishi N, Takahashi T, Isogai M, Takahashi H, Yoshikawa N. 2009. 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. *Virology*, 386 (2): 407 – 416.
- Ishiga Y, Ishiga T, Wangdi T, Mysore K S, Uppalapati S R. 2012. NTRC and chloroplast-generated reactive oxygen species regulate *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* disease development in tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25 (3): 294 – 306.
- Jiang C Z, Lu F, Imsabai W, Meir S, Reid M S. 2008. Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. *Journal of Experimental Botany*, 59 (4): 973 – 979.
- Kandath P K, Ranf S, Pancholi S S, Jayanty S, Walla M D, Miller W, Howe G A, Lincoln D E, Stratmann J W. 2007. Tomato MAPKs *LeMPK1*, *LeMPK2*, and *LeMPK3* function in the system in mediated defense response against herbivorous insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (29): 12205 – 12210.
- Kud J, Zhao Z L, Du X R, Liu Y L, Zhao Y, Xiao F M. 2013. SGT1 interacts with the Prf resistance protein and is required for *Prf* accumulation and *Prf*-mediated defense signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 431 (3): 501 – 505.
- Li C W, Su R C, Cheng C P, Sanjaya Y S J, Hsieh T H, Chao T C, Chan M T. 2011a. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the *AP2/EREBP*-mediated defense pathway. *Plant Physiology*, 156 (1): 213 – 227.
- Li L, Zhu B Z, Fu D Q, Luo Y B. 2011b. RIN transcription factor plays an important role in ethylene biosynthesis of tomato fruit ripening. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 91 (13): 2308 – 2314.
- Li Q, Xie Q G, Smith-Becker J, Navarre D A, Kaloshian I. 2006. Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (6): 655 – 664.
- Lim C J, Kim W B, Lee B S, Lee H Y, Kwon T H, Park J M, Kwon S Y. 2010. Silencing of *SIFTR-c*, the catalytic subunit of ferredoxin: Thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 399 (4): 750 – 754.
- Lin Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K, Grierson D. 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal*, 55 (2): 301 – 310.
- Liu Qing, Feng Dong-xin, Wang Xiao-wu, Du Yong-chen. 2006. Cloning and functional analysis of the genes involved in signal transduction in tomato *Cf-4-Avr4* pathosystem. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 52 – 57. (in Chinese)
- 刘庆, 冯东昕, 王晓武, 杜永臣. 2006. 番茄 *Cf-4-Avr4* 互作系统中信号转导基因的克隆与功能分析. *园艺学报*, 33 (1): 52 – 57.
- Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. 2002b. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31 (6): 777 – 786.
- Liu Y L, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar S P. 2002a. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIM1* like genes are required for N mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30 (4): 415 – 429.
- Lu Liang-liang, Fu Da-qi, Liu Hai-ping, Wang Xiao-hui, Luo Yun-bo, Zhu Ben-zhong, Zuo Jin-hua. 2011. Construction and identification VIGS vector about vitamin E biosynthesis gene of tomato. *Northern Horticulture*, 16: 139 – 142. (in Chinese)
- 芦亮亮, 傅达奇, 刘海萍, 王晓辉, 罗云波, 朱本忠, 左进华. 2011. 番茄中维生素 E 合成相关基因的 VIGS 载体构建及侵染. *北方园艺*, 16: 139 – 142.
- Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30 (4): 296 – 303.
- Malinowski R, Higgins R, Luo Y, Piper L, Nazir A, Bajwa V S, Clouse S D, Thompson P R, Stratmann J W. 2009. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. *Plant Molecular Biology*, 70 (5): 603 – 616.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson A J, King G J, Giovannoni J J, Seymour G B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*, 38 (8): 948 – 952.
- Mantelin S, Bhattarai K K, Jhaveri T Z, Kaloshian I. 2013. *Mi-1*-mediated resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato may not rely on ethylene but hormone perception through participates in limiting nematode infection in a susceptible host. *PLoS One*, 8 (5): e63281.
- Mantelin S, Peng H C, Li B, Atamian H S, Takken F L, Kaloshian I. 2011. The receptor-like kinase *SISERK1* is required for *Mi-1*-mediated resistance to potato aphids in tomato. *The Plant Journal*, 67 (3): 459 – 471.

- Mayrose M, Ekengren S K, Melech-Bonfil S, Martin G B, Sessa G. 2006. A novel link between tomato *GRAS* genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology*, 7 (6): 593 – 604.
- Melech-Bonfil S, Sessa G. 2011. The SIMKK2 and SIMPK2 genes play a role in tomato disease resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (1): 154 – 156.
- Pandey P, Choudhury N R, Mukherjee S K. 2009. A geminiviral amplicon VA derived from Tomato leaf curl virus ToLCV can replicate in a wide variety of plant species and also acts as a VIGS vector. *Virology Journal*, 6: 152.
- Quadrana L, Rodriguez M C, López M. 2011. Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in *Arabidopsis* and across all stages of tomato fruit development. *Plant Physiology*, 156 (3): 1278 – 1291.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, 25 (2): 237 – 245.
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones J D. 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO Journal*, 23 (10): 2156 – 2165.
- Robertson D. 2004. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 495 – 519.
- Romero I, Tikunov Y, Bovy A. 2011. Virus-induced gene silencing in detached tomatoes and biochemical effects of phytoene desaturase gene silencing. *Journal of Plant Physiology*, 168 (10): 1129 – 1135.
- Ryu C M, Anand A, Kang L, Mysore K S. 2004. Agrodrench: A novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *The Plant Journal*, 40 (2): 322 – 331.
- Scofield S R, Nelson R S. 2009. Resources for virus-induced gene silencing in the grasses. *Plant Physiology*, 149 (1): 152 – 157.
- Senthil-Kumar M, Mysore K S. 2011. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 9 (7): 797 – 806.
- Senthil-Kumar M, Udayakumar M. 2006. High-throughput virus induced gene-silencing approach to assess the functional relevance of a moisture stress-induced cDNA homologous to *lea4*. *Journal Experimental Botany*, 57 (10): 2291 – 2302.
- Slocombe S P, Schauvinhold I, McQuinn R P, Besser K, Welsby N A, Harper A, Aziz N, Li Y, Larson T R, Giovannoni J, Dixon RA, Broun P. 2008. Transcriptomic and reverse genetic analyses of branched-chain fatty acid and acyl sugar production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, 148 (4): 1830 – 1846.
- Stulemeijer I J, Stratmann J W, Joosten M H. 2007. Tomato mitogen-activated protein kinases LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 are activated during the Cf-4/Avr4-induced hypersensitive response and have distinct phosphorylation specificities. *Plant Physiology*, 144 (3): 1481 – 1494.
- Tang Y, Wang F, Zhao J P, Xie K, Hong Y G, Liu Y L. 2010. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants. *Plant Physiology*, 153 (2): 632 – 641.
- Tao X R, Zhou X P. 2004. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *The Plant Journal*, 38 (5): 850 – 860.
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485 (7400): 635 – 641.
- Uppalapati S R, Ishiga Y, Ryu C M. 2011. SGT1 contributes to coronatine signaling and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* disease symptom development in tomato and *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 189 (1): 83 – 93.
- Valentine T, Shaw J, Blok V C, Phillips M S, Oparka K J, Lacomme C. 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiology*, 136 (4): 3999-4009.
- van Schie C C, Ament K, Schmidt A, Lange T, Haring M A, Schuurink R C. 2007. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *The Plant Journal*, 52 (4): 752 – 762.
- Vossen J H, Abd-El-Halim A, Fradin E F, van den Berg G C, Ekengren S K, Meijer H J, Seifi A, Bai Y, ten Have A, Munnik T, Thomma B P, Joosten M H. 2010. Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *The Plant Journal*, 62 (2): 224 – 239.
- Wang Xiao-guang, Ma Yuan-zheng, Wang Xiao-hui, Li Ling, Luo Yun-bo, Zhu Ben-zhong. 2009. Construction of a normalized cDNA silencing library of tomato fruit and model establishment of screening specific functions of genes. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 36 (8):

- 1079 - 1083. (in Chinese)
- 王晓光, 马远征, 王晓辉, 李 玲, 罗云波, 朱本忠. 2009. 破色期番茄果实均一化 cDNA 沉默文库的构建和功能基因筛选模型的初步建立. 生物化学与生物物理进展, 36 (8): 1079 - 1083.
- Wangdi T, Uppalapati S R, Nagaraj S. 2010. A virus-induced gene silencing screen identifies a role for thylakoid formation1 in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* symptom development in tomato and *Arabidopsis*. Plant Physiology, 152 (1): 281 - 292.
- Yang C W, González-Lamothe R, Richard A. 2006. The E3 Ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog *ACRE276* are required for cell death and defense. Plant Cell, 18 (4): 1084 - 1098.
- Yang Y, Wu Y, Pirrello J, Regad F, Bouzayen M, Deng W, Li Z. 2010. Silencing *Sl-EBF1* and *Sl-EBF2* expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato. Journal of Experimental Botany, 61 (3): 697 - 708.
- Yang Ying-wu, Li Zheng-guo, Mondher Bouzayen. 2008. Tissue specificity analysis of virus-induced gene silencing in tomato. Acta Horticulturae Sinica, 35 (2): 227 - 232. (in Chinese)
- 杨迎伍, 李正国, Mondher Bouzayen. 2008. 病毒诱导的基因沉默在番茄组织中的特异性分析. 园艺学报, 35 (2): 227 - 232.
- Yu G B, Zhang Y, Ahammed G J, Xia X J, Mao W H, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. 2013. Glutathione biosynthesis and regeneration play an important role in the metabolism of chlorothalonil in tomato. Chemosphere, 90 (10): 2563 - 2570.
- Yu Guo-hong, Ma Xue-feng, Xu Na, Xin Shi-chao, Cheng Xian-guo. 2012. Profile of drought resistance of tomato transcription factor SIDREB2 gene mediated by VIGS. Biotechnology Bulletin, (12): 93 - 100. (in Chinese)
- 于国红, 马雪峰, 徐 娜, 辛世超, 程宪国. 2012. VIGS 介导的番茄转录因子 SIDREB2 基因的耐旱特征. 生物技术通报, (12): 93 - 100.

征 订

《中国蔬菜栽培学》(第 2 版)

《中国蔬菜栽培学》(第 2 版)于 2009 年 10 月由中国农业出版社出版发行。全书约 250 万字,分总论、各论、保护地蔬菜栽培、采后处理及贮藏保鲜共 4 篇。总论篇概要地论述了中国蔬菜栽培的历史、产业现状,中国蔬菜的起源、来源和种类,蔬菜作物生长发育和器官形成与产品质量的关系,蔬菜生产分区、栽培制度和技术原理,蔬菜栽培的生理生态基础以及环境污染与蔬菜的关系等;各论篇较详细地介绍了根菜类、薯芋类、葱蒜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、叶菜类、瓜类、茄果类、豆类、水生类、多年生类、芽苗菜以及食用菌类蔬菜的优良品种、栽培技术、病虫害综合防治、采收等方面的技术经验和研究成果;保护地蔬菜栽培篇论述了中国蔬菜保护地的类型、构造和应用,主要栽培设施的设计、施工,保护地环境及调节,保护地蔬菜栽培技术;采后处理及贮藏保鲜篇重点介绍了蔬菜采后处理技术及贮藏原理和方法等。

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编,组织全国有较高学术水平和实际工作经验的专家、学者和技术人员 130 余人分别撰写,反映了 21 世纪初中国蔬菜栽培科学研究和蔬菜生产技术的水平,内容较全面、系统,科学性、学术性强,亦有较强的实用性,插有近 500 张彩图,可供相关科研人员、农业院校师生、专业技术及管理人员等参考。

定价: 330 元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。