

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202502013

# 辣椒黄化环斑病毒主要功能基因 *N*、*NSs*、*NSm* 的 VIGS 体系构建及效率验证

李 好<sup>1,2</sup>, 陈永对<sup>1,2</sup>, 吴 阔<sup>1,2</sup>, 马传智<sup>3</sup>, 张 洁<sup>1,2\*</sup>, 张仲凯<sup>1,2</sup>

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650205; 2. 云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650205; 3. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650500)

**摘要:** 辣椒黄化环斑病毒 (chilli yellow ringspot virus, CYRSV) 严重危害多种经济作物和园艺作物, 其主要功能基因 *N*、*NSs*、*NSm* 与病毒侵染密切相关, 构建 *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS (Virus-induced gene silencing) 体系以研究其致病功能的研究还未报道。为构建 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的 VIGS 沉默体系, 分析 *N*、*NSs*、*NSm* 基因在 CYRSV 侵染中的作用, 该研究将 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的 300 bp 左右靶片段分别构建到 pTRV2 沉默载体上, 在不同接种模式下检测各基因的沉默效率, 最后选择最佳接种模式再次在本氏烟和辣椒中进行沉默效率检测, 应用绝对实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数。结果显示, 在本氏烟上 *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 体系的沉默效率分别为 82.07%、87.02%、94.39%; 在辣椒上 *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 体系的沉默效率分别为 86.63%、89.22%、83.43%。该研究成功构建了 CYRSV 的 *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 沉默体系, 能高效抑制 CYRSV 侵染本氏烟和辣椒过程中 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数, 抑制效率在 82% 和 95% 之间。该研究构建的 *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 沉默体系能为后续研究 CYRSV 的致病机理提供前期材料, 也为 CYRSV 抗病育种和田间绿色防控提供一定的理论依据。

**关键词:** 辣椒黄化环斑病毒, 病毒诱导的基因沉默, 实时荧光定量 PCR, 拷贝数, 本氏烟, 辣椒  
中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号:

## Establishment and efficiency validation of VIGS systems for the main functional genes *N*, *NSs* and *NSm* of chilli yellow ringspot virus

LI Yu<sup>1,2</sup>, CHEN Yongdui<sup>1,2</sup>, WU Kuo<sup>1,2</sup>, MA Chuanzhi<sup>3</sup>, ZHANG Jie<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Zhongkai<sup>1,2\*</sup>

(1. Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650205, China; 3. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Chilli yellow ringspot virus (CYRSV) causes severe diseases in many economically important plants such as cash crops and horticultural flora, its major functional genes (*N*, *NSs*, *NSm*) have closely relationship with viral infection, However, no report has described the construction of a VIGS system

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32360638); 云南省科技计划项目基础研究专项青年项目 (202301AU070121); 云南省科技计划项目基础研究专项面上项目 (202501AT070087); 云南省科技计划项目基础研究专项重大项目 (202501BC070017); 云南省种子种业联合实验室 (202205AR070001)。

**第一作者:** 李好 (1990—), 博士, 助理研究员, 研究方向为植物病毒与寄主互作, (E-mail) liziyu19901211@126.com。

**\*通信作者:** 张洁, 博士, 研究员, 研究方向为植物病虫害, (E-mail) zhengjun2314@126.com。

containing *N*, *NSs*, *NSm* genes to study its pathogenic function. To address this, a VIGS silencing system was constructed for the *N*, *NSs* and *NSm* genes of CYRSV, and the roles of these genes during CYRSV infection were analyzed. Approximately 300 bp target fragments of CYRSV *N*, *NSs* and *NSm* genes were respectively inserted into the pTRV2 silencing vector. The silencing efficiency of each gene was detected under different inoculation modes. The optimal inoculation method was selected and further validated in *N.benthamiana* and pepper plants. The copy number of *N*, *NSs* and *NSm* genes was quantified using absolute quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that the silencing efficiency for VIGS system of *N*, *NSs*, *NSm*-VIGS system were 82.07%, 87.02%, and 94.39%, respectively, in *N.benthamiana*, and 86.63%, 89.22%, 83.43%, respectively, in pepper, compared with the control group. This study successfully established a VIGS system targeting the *N*, *NSs* and *NSm* genes of CYRSV, which effectively inhibit the copy number of *N*, *NSs* and *NSm* genes in *N.benthamiana* and pepper, with silencing efficiencies ranging from 82% to 95%. The *N*, *NSs* and *NSm* VIGS system developed in this study provides a valuable tool for future investigations into the pathogenesis of CYRSV and offers a theoretical basis for resistance breeding and environmentally friendly control strategies in the field.

**Key words:** chilli yellow ringspot virus, VIGS, qRT-PCR, copy number, *Nicotiana benthamiana*; pepper

在中国，已报道了多种正番茄斑萎病毒属病毒，包括番茄斑萎病毒（TSWV）、辣椒褪绿病毒（CaCV）、西瓜银斑病毒（WSMoV）等。2014年，在云南红河哈尼族彝族自治州石屏县采集到一株表现出叶片黄环斑和坏死症状的辣椒植株，从中分离出了一种正番茄斑萎病毒属（*orthospovirus*）病毒，并命名为辣椒黄化环斑病毒（chilli yellow ringspot *orthospovirus*, CYRSV）（Zheng et al., 2020）。目前，由正番茄斑萎病毒属病毒侵染辣椒、番茄等作物引起的病毒病已经成为全球范围的主要病毒病害（于海龙等，2020；刘勇等，2021）。近十年来，正番茄斑萎病毒病在中国迅速扩散，现已蔓延到19个省份。寄主植物感染正番茄斑萎病毒属病毒后的症状极其相似，主要症状包括环斑（包括褪绿斑、黄斑、坏死斑和带状斑）、芽坏死、银色斑驳和脉带。褪绿斑、黄斑和坏死斑可出现在病毒侵染的所有阶段（早期、中期和晚期）（Zhang et al., 2021）。

辣椒黄化环斑病毒（chilli yellow ringspot virus, CYRSV）属布尼亚病毒目（*Bunyavirales*）番茄斑萎病毒科（*Tospoviridae*）正番茄斑萎病毒属（*Orthospovirus*）病毒。CYRSV 侵染寄主后，植株会表现出生长受限、矮缩，叶片出现黄化环斑、紫脉等症状；果实会出现褪绿黄化、同心圆斑、黄化环斑等症状；感染严重的植株会出现坏死。CYRSV 与其他正番茄斑萎病毒属病毒相似，是直径大小约为 80~120 nm 的球状病毒，为三分体基因组，包含大、中、小 3 个基因片段，编码主要 CYRSV 功能蛋白的基因有 *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因，以及编码糖蛋白的 *Gn/Gc* 和编码 RNA 聚合酶的 *RdRp*，这些主要功能基因与病毒的分类、运动及系统侵染能力均有密切联系。其中 *N* 基因编码 CYRSV 的结构蛋白-核衣壳蛋白，*NSm* 和 *NSs* 编码 CYRSV 的非结构蛋白，*NSm* 编码与病毒迁移、传播相关的蛋白，*NSs* 编码病毒沉默抑制子（杨婷婷等，2022）。目前，有关 CYRSV 侵染机制的研究仍处于空白阶段。*N* 蛋白是正番茄斑萎病毒属病毒中最稳定、最保守的蛋白，*N* 蛋白序列相似度是用于鉴定划分种和血清组的主要依据（张仲凯等，2004；陈坤荣等，2005；桂敏等，2022），因此利用核壳体蛋白基因（*N*）设计引物进行 RT-PCR 扩增现已成为鉴定该属病毒的关键方法。CYRSV 在国内尚未见详细研究报道，研究 CYRSV 功能蛋白对深入研究 CYRSV 病毒侵染机制尤其重要。

病毒诱导的基因沉默（virus-induced gene silencing, VIGS）是指通过将目的基因片段构建至 VIGS 载体上，获得重组病毒载体，注射植株后，随着病毒的感染与扩散，激发植物免疫反应机制，进而实现对靶基因的沉默（任恒泽等，2024）。VIGS 具备操作简便、高效完成、周期时间短、不需要获取转基因植株、高通量等优势，是研究功能基因组和特定基因功能的有用工具（侯巧明等，

2015; 魏正欣等, 2022)。VIGS 的沉默效率和插入片段与目的基因的同源性程度有着很大的关联。一般来说, VIGS 的沉默效率和插入片段与靶基因两者的同源性越高, 病毒诱导引发的基因沉默效率也越高(张丽英, 2022)。2019 年, Choi 等人研发了基于蚕豆萎蔫病毒(Broad bean wilt virus, BBWV)的 VIGS 载体, 并在各种各样的辣椒品种中成功抑制了 PDS 基因, 这也为辣椒作物的基因功能方面的研究提供了新的 VIGS 工具(郝梦媛等, 2022)。目前, 关于 CYRSV 中 *N*、*NSm* 和 *NSs* 基因的 VIGS 沉默体系相关研究还未见报道。构建 CYRSV 主要功能蛋白相关沉默载体对深入研究 CYRSV 病毒侵染机制尤其重要, 本研究将 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的 300 bp 左右靶片段分别构建到 pTRV2 沉默载体上, 以农杆菌介导的方法注射到本氏烟和辣椒中, 2 d 后对本氏烟进行 CYRSV 摩擦接种。注射 12 d 后采集系统叶应用绝对实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数。本研究运用 VIGS 技术构建的 *N*、*NSm* 和 *NSs* 基因沉默载体, 以更好地了解该病毒的遗传结构与作用机制, 为深入研究 CYRSV 的致病机理提供研究材料和有力依据, 为实现 CYRSV 的绿色防控提供理论依据和实验手段。

本研究以构建 CYRSV 的主要功能基因 *N*、*NSs*、*NSm* 为研究对象, 基于 pTRV 载体的 VIGS 沉默体系, 采用同源重组和实时荧光定量 PCR 的方法, 构建了 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 沉默体系, 并进一步探讨以下问题: (1) *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 体系的靶基因片段长度; (2) *N*、*NSs*、*NSm* 基因 VIGS 沉默体系在本氏烟中的效率; (3) VIGS 沉默体系和 CYRSV 接种的时间先后; (4) CYRSV 侵染过程中 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的重要性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

辣椒黄化环斑病毒毒源、本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和辣椒品种‘思椒’种子均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团队保存提供。pTRV1、pTRV2 载体, 以及 pTRV2-PDS 沉默载体来自云南农业大学李凡教授课题组。

### 1.2 *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因 VIGS 靶序列扩增

按照本实验室扩增测序获得的 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 编码序列选择靠近 5' 端 300 bp 左右的序列作为 VIGS 沉默靶序列, 并以同源重组的方法设计引物: pTRV2-*N*、pTRV2-*NSs*、pTRV2-*NSm* 引物序列见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以实验室保存的感染 CYRSV 的番茄 (Zhang et al., 2025) cDNA 为模板, 应用 2 × Accurate Taq 预混液 (湖南艾科瑞生物工程有限公司) 扩增 *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因目的片段。PCR 的反应体系: 2 × Accurate Taq Master Mix 12.5 μL, 模板 1 μL, 引物上下游各 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 程序: 94 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 最终延伸 2 min。扩增产物经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳, UV 凝胶成像系统拍照。将扩增产物按照琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒 (苏州优逸兰迪生物科技有限公司) 说明书进行 DNA 回收纯化, 以获得目的基因。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物名称                 | 引物序列 (5'-3')                 | 长度          |
|----------------------|------------------------------|-------------|
| Primer name          | Primer sequence (5'-3')      | Length (bp) |
| pTRV2- <i>N</i> -F   | AGAAGGCCTCCATGGGGATCCGTTAAG  | 307         |
|                      | CAACTTACAGAGAAGAAAATCA       |             |
| pTRV2- <i>N</i> -R   | CGTGAGCTCGGTACCGGATCCTGACCAT |             |
|                      | TTTTGTCCTAATAAAAGCT          |             |
| pTRV2- <i>NSs</i> -F | AGAAGGCCTCCATGGGGATCCCTAACGT | 303         |

|              |   |     |
|--------------|---|-----|
|              | GTTAGAATCTTTATGCCCT                                 |     |
| pTRV2-NSs-R  | CGTGAGCTCGGTACCGGATCCCAACAA<br>GTGAATCATTTTTCCAATTG |     |
| pTRV2-NSm-F  | AGAAGGCCTCCATGGGGATCCCATCAA                         | 300 |
|              | CGATTTGAGCAGGAATG                                   |     |
| pTRV2-NSm-R  | CGTGAGCTCGGTACCGGATCCCACCATC<br>CTGAAGGAAGTAACCC    |     |
| CYRSV-qN-F   | GCGGTACTGCAGATGTTGAA                                | 224 |
| CYRSV-qN-R   | GGTCCAATCTTCTGGTCCAA                                |     |
| CYRSV-qNSs-F | ACAGGCTGCAAGTTCTCCAT                                | 225 |
| CYRSV-qNSs-R | GCCCATGACAGAGAAACCAT                                |     |
| CYRSV-qNSm-F | GCTGTTGAAGCCACATCTGA                                | 198 |
| CYRSV-qNSm-R | GGTCGGGACAATCCAAACTA                                |     |

### 1.3 N、NSs 和 NSm 的 VIGS 载体构建及农杆菌转化

采用限制性内切酶 BamH I对pTRV2载体进行单酶切,酶切反应体系:模板2  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ , BamH I 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 42  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育20 min。将单酶切产物进行DNA纯化后测浓度备用,保证浓度足够。根据OK Clon DNA连接试剂盒III(湖南艾科瑞生物工程有限公司)说明书操作,用 $2.5 \times$  OK Clon Ligation Kit II试剂盒将目的基因与pTRV2载体连接起来,反应体系: $2.5 \times$  OK Clon Master Mix 4  $\mu\text{L}$ , pTRV2载体 4  $\mu\text{L}$ , 基因片段 2  $\mu\text{L}$ , 总量 10  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 50  $^{\circ}\text{C}$  反应10 min。将以上连接产物转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,在含卡那霉素抗性的LB平板上筛选单克隆,将单克隆进行菌落PCR鉴定,最后将PCR阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,经序列比对分析,测序正确的阳性克隆菌液按照Trelief<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit Plus高纯度质粒小提试剂盒进行质粒提取,最终获得的载体质粒则为pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm重组载体。将重组质粒pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm通过液氮速溶法转入农杆菌GV3101感受态细胞中,在卡那霉素(100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和利福平(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的抗性条件下筛选阳性菌。用PCR扩增引物进行菌液PCR验证,有目的条带的阳性克隆菌液则为pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm重组载体农杆菌菌液。

### 1.4 VIGS 载体农杆菌注射及 CYRSV 接种方法

侵染液配制: 50 mL灭菌水, 50  $\mu\text{L}$  AS, 25  $\mu\text{L}$  MES, 500  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub>。将摇匀的菌液以5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心10 min, 弃上清。在常温下, 3 000  $\times g$ 离心收集pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm、pTRV2-PDS、pTRV1及pTRV2载体菌体,使用适量的侵染液分别悬浮适量的菌沉淀,分光光度计测OD值,保证菌液OD值为0.6~1.0, 28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱避光静置6~8 h待用。浸染注射: 分别将载体pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm、pTRV2-PDS以及pTRV2的侵染液与pTRV1侵染液按1: 1的体积充分混匀,使用1 mL注射器吸满侵染液,利用针头轻柔地戳待注射叶片下表皮(选择生长状况良好适合的本氏烟和辣椒叶片),用左手食指轻轻抵住上表皮,将针筒对准针眼孔缓慢注射,侵染液进入叶片的四分之一即可。摩擦接种CYRSV: 首先将研钵放在冰上,再将CYRSV毒源从-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,加入适量PBS缓冲液,在研钵中研磨碎后用金刚砂和棉签摩擦接种CYRSV。随后,在温室中继续培养。组别设置如下, pTRV2组: 注射VIGS空体系菌液并接种CYRSV, 注射顺序与对应目标基因VIGS体系一致; CYRSV 2 d+pTRV2-N/NSs/NSm-10 d组: CYRSV接种后2 d注射N/NSs/NSm-VIGS体系, 10 d后取样; CYRSV+pTRV2-N/NSs/NSm-10 d组: CYRSV接种后马上注射N/NSs/NSm-VIGS体系, 10 d后取样; pTRV2-N/NSs/NSm-2 d+ CYRSV 10 d: N/NSs/NSm-VIGS体系注射后2 d接种CYRSV, 10 d后取样; pTRV2-N/NSs/NSm-5 d+ CYRSV 10 d: N/NSs/NSm-VIGS体系注射后5 d接种CYRSV, 10 d后取样; pTRV2-N/NSs/NSm-8 d+ CYRSV 10 d: N/NSs/NSm-VIGS体系

注射后8 d接种CYRSV, 10 d后取样; 每组包含3株本氏烟或辣椒, 实验重复3次。同时, 设置pTRV1/pTRV2-PDS菌液注射的本氏烟作为指示对照。

### 1.5 N、NSs、NSm绝对荧光定量 PCR 标准曲线的建立

Pimer 3.0 Plus在线设计*N*、*NSs*、*NSm*的荧光定量PCR引物, 序列见表1。PCR的反应体系: 2 x Accurate Taq Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 引物上下游各0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ 。PCR程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性10 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸1 min, 共34个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  最终延伸2 min。扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增产物进行胶回收后, 连接在pMD-T19克隆载体(宝生物工程大连有限公司)上, 如下: pMD19-T Vector 1  $\mu\text{L}$ , DNA模板1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{L}$ 。加入5  $\mu\text{L}$ 的Solution I。16  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min (PCR仪)。将PCR阳性克隆送生工测序, 经序列比对分析, 测序正确的阳性克隆菌液按照Trelief<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit Plus高纯度质粒小提试剂盒进行质粒提取, 最终获得*N*、*NSs*、*NSm*/pMD-T19质粒标准品; 对质粒标准品进行浓度测定, 依据拷贝数的计算公式: 拷贝数(Copies/ $\mu\text{L}$ ) =  $A \times 6.02 \times 10^{23} / B$  ( $A$ 为质粒浓度 $\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $B$ 为质粒DNA分子量 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 计算出每个质粒标准品的病毒拷贝数; 将*N*、*NSs*、*NSm*/pMD19-T质粒梯度稀释成具有10倍浓度梯度的标准品, 分别用于建立*N*、*NSs*和*NSm*基因的标准曲线。

以CYRSV-qN-F/R、CYRSV-qNSs-F/R、CYRSV-qNSm-F/R为荧光定量PCR引物, 采用SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行荧光定量PCR反应, 荧光定量PCR反应体系如下: 标准品 1  $\mu\text{L}$ , 2 x SYBR Green Pro Taq HS Premix 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{L}$ , 总体积10  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s、60  $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、40个循环, 95  $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 15 s。增加溶解曲线。以标准品的CT值作为纵坐标, 相应的拷贝数的对数作为横坐标, 建立CYRSV *N*、*NSs*和*NSm*基因的标准曲线。

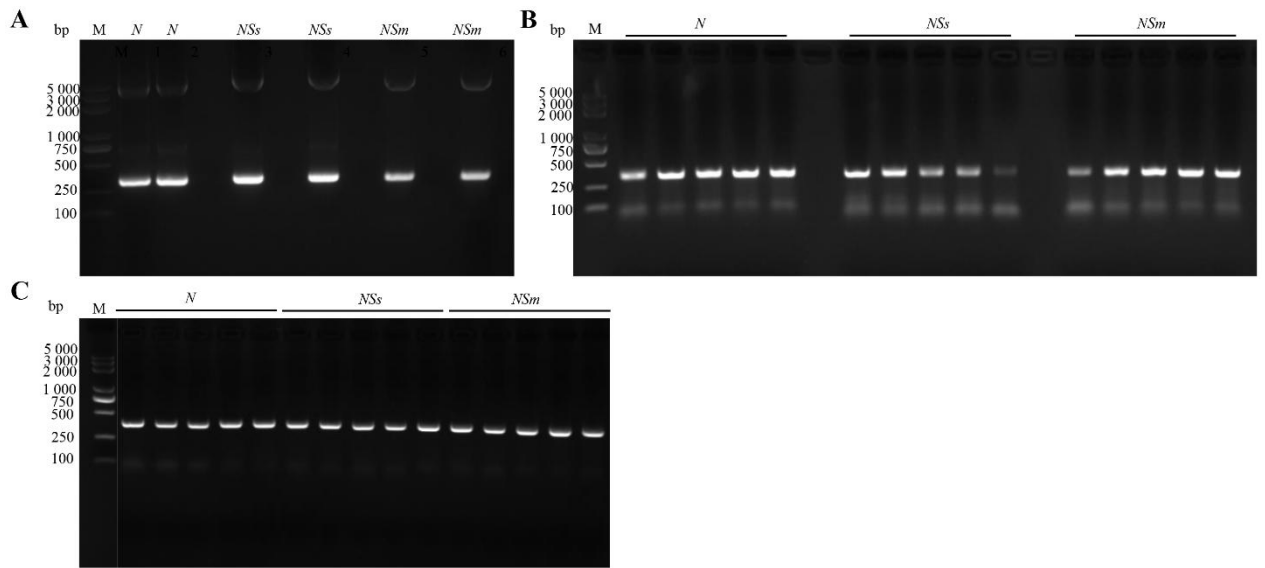
### 1.6 N、NSs、NSm 的 VIGS 载体抑制效率验证

所采叶片样品总 RNA 按照 SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)说明书进行提取。将总 RNA 按照 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)说明书进行反转录, 各样本 cDNA 稀释 5 倍后待用, 荧光定量 PCR 检测步骤同 1.5。各样品中 *N*、*NSs*、*NSm* 的拷贝数计算: 将待测样品 CT 值代入对应标准曲线中, 计算出待测样品中 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数, 随后乘以稀释倍数 5 即为各样本中 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数。按照公式计算每个基因拷贝数的抑制效率, 抑制效率 (%) =  $(C-T) / C \times 100\%$  ( $C$ : 仅接种 CYRSV 病毒的植株叶片中目的基因拷贝数的平均值;  $T$ : 注射 VIGS 沉默载体的植株叶片目的基因的平均拷贝数值)。

## 2 结果与分析

### 2.1 CYRSV N、NSs、NSm 的 VIGS 载体构建及农杆菌转化结果

*N*、*NSs* 和 *NSm* 基因的 VIGS 靶片段大小分别为 307、303、300 bp, PCR 扩增后电泳观察目的条带位置正确(图 1: A), 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序比对成功的 PCR 产物进行胶回收, 测浓度后备用。将上一步回收的靶片段与酶切回收后的 pTRV2 载体进行同源重组。经过转化筛选, 挑选单克隆进行菌落 PCR 检测(图 1: B)。将 PCR 检测条带位置正确的阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 经序列比对分析, 将测序正确的阳性克隆菌液扩繁后进行质粒的抽取, 最终成功获得重组载体质粒 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-Nsm。测得 pTRV2-N 浓度: 544.941  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , pTRV2-NSs 浓度: 498.822  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , pTRV2-Nsm 浓度: 483.800  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。利用液氮速溶法, 将上述质粒及 pTRV2-PDS 分别转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 挑选单克隆进行菌落 PCR 检测(图 1: C)。PCR 条带位置正确, 表明成功获得了 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-Nsm 以及 pTRV2-PDS 重组载体农杆菌菌液, 可继续开展后续的沉默效率检测。



A. N、NSs、Nsm 片段的 PCR 产物电泳图；B. pTRV2-N、NSs、NSm 重组载体菌落 PCR 电泳图；C. pTRV2-N、NSs、NSm 质粒转化 GV3101 后的菌落 PCR 电泳图。

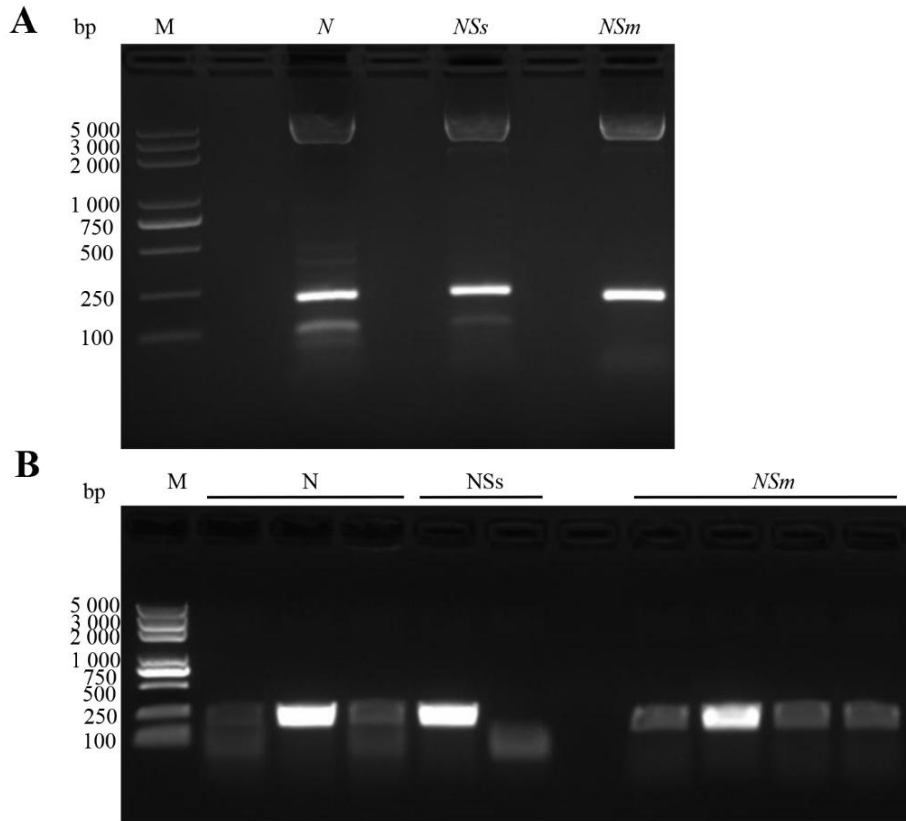
A. The agarose gel electrophoresis results of PCR product for N, NSs, NSm; B. The agarose gel electrophoresis results of PCR product for pTRV2-N, NSs, NSm recombinant vector; C. The agarose gel electrophoresis results of GV3101 containing pTRV2-N, NSs, NSm.

### 图 1 pTRV2/N、NSs、NSm 重组载体及农杆菌菌落的电泳检测结果

Fig. 1 Analysis of pTRV2/N, NSs, NSm recombinant vector and agrobacterium colony by agarose gel electrophoresis

### 2.2 N、NSs、NSm 基因绝对荧光定量 PCR 标准曲线的建立

以 CYRSV-qN、qNSs、qNSm 引物进行 PCR 扩增获得目的片段（图 2：A），将目的条带胶回收后克隆到 pMD19-T 载体上，经菌落 PCR（图 2：B）后将测序正确的阳性克隆进行质粒提取，最终成功获得 N/pMD19-T、NSs/pMD19-T、NSm/pMD19-T 重组载体，浓度分别为  $298.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $355.7 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  和  $429.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。利用公式计算出 N/pMD19-T、NSs/pMD19-T 和 NSm/pMD19-T 质粒的拷贝数分别为  $0.94 \times 10^{11}$ 、 $1.1 \times 10^{11}$  和  $1.1 \times 10^{11}$ 。依次将标准质粒稀释成 8 个拷贝数浓度，N/pMD19-T 质粒的拷贝数梯度为  $0.94 \times 10^2$ 、 $0.94 \times 10^3$ 、 $0.94 \times 10^4$ 、 $0.94 \times 10^5$ 、 $0.94 \times 10^6$ 、 $0.94 \times 10^7$ 、 $0.94 \times 10^8$ ，NSs/pMD19-T 和 NSm/pMD19-T 的拷贝数梯度均为  $1.1 \times 10^2$ 、 $1.1 \times 10^3$ 、 $1.1 \times 10^4$ 、 $1.1 \times 10^5$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^7$ 、 $1.1 \times 10^8$ 。荧光定量 PCR 检测后，以拷贝数的对数作为横坐标，CT 值作为纵坐标，分别绘制出 CYRSV N、NSs、NSm 的标准曲线（图 3）。N 基因标准曲线方程： $y = -3.279 9x + 37.15$ ， $R^2$  系数为 0.997 5；NSs 基因标准曲线方程： $y = -3.235 1x + 38.332$ ， $R^2$  系数为 0.998 4；NSm 基因标准曲线方程： $y = -3.140 3x + 35.409$ ， $R^2$  系数为 0.998。 $R^2$  系数越接近 1，表明实验操作精准度越高，在 N、NSs、NSm 基因标准曲线中，CT 值与标准质粒浓度之间呈现出良好的线性关系，可用于后续拷贝数分析。

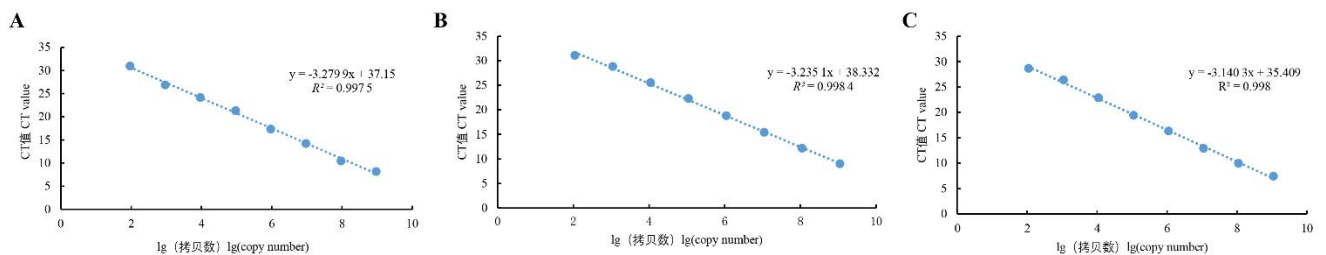


A. *N*、*NSs*、*NSm* 标准片段的 PCR 产物电泳图； B. *N*、*NSs* 和 *NSm*/T 载体菌落 PCR 电泳图。

A. The agarose gel electrophoresis results of PCR product for *N*, *NSs*, *NSm* standard fragments; B. The agarose gel electrophoresis results of PCR product for *N*, *NSs* and *NSm*/T vectors.

图 2 *N*、*NSs*、*NSm* 片段及 T 载体菌落的 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Analysis of PCR products for *N*, *NSs*, *NSm* fragments and its T-vector colony by agarose gel electrophoresis



A、B、C 分别表示 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的标准曲线。

A, B, C indicate the standard curve of *N*, *NSs*, *NSm* genes, respectively.

图 3 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的绝对荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of absolute qRT-PCR for CYRSV *N*, *NSs* and *NSm* genes

## 2.4 不同接种方法下，pTRV2-*N*、pTRV2-*NSs*、pTRV2-*NSm* VIGS 体系在本氏烟中的沉默效率检测

pTRV2-PDS 作为 VIGS 沉默体系的指示对照，PDS-VIGS 载体注射烟草后 12 d，烟草叶片出现白化症状，pTRV2 空载体植株则没有出现任何表型变化（图 4），这表明实验所用的 VIGS 体系和侵染方法在本氏烟中成功发挥作用。

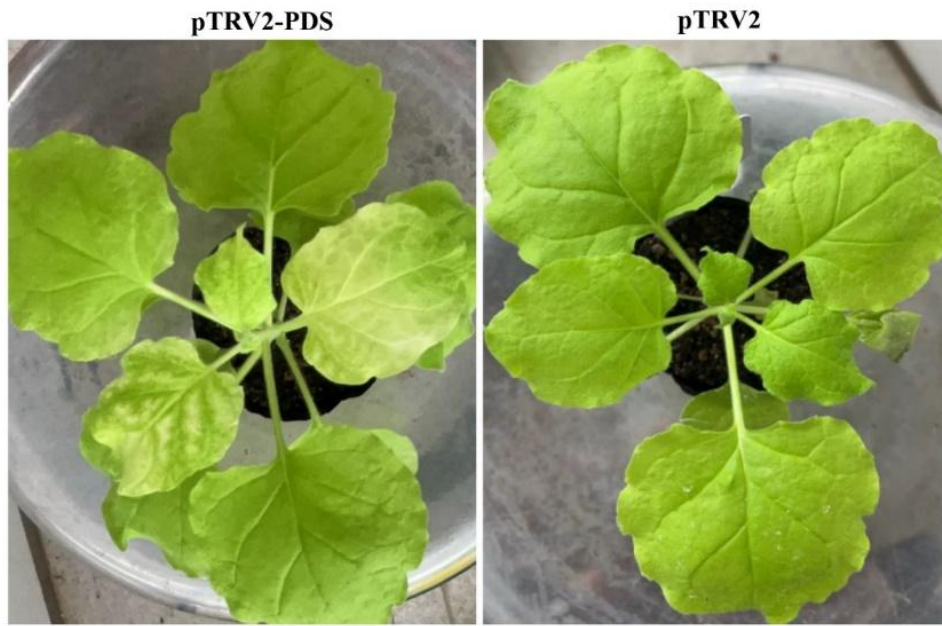
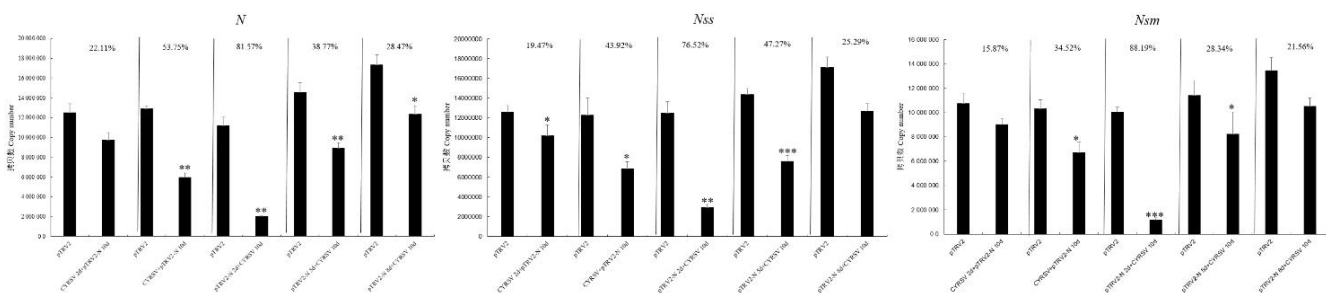


图 4 pTRV2-PDS 和 pTRV2 空载体侵染后本氏烟叶片的光漂白症状

Fig. 4 Photobleaching of *Nicotiana benthamiana* after pTRV2-PDS and pTRV2 empty vector inoculation

为了探索不同接种模式下 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm VIGS 体系的沉默效率，我们在本氏烟中设置了 5 种接种模式：①CYRSV 接种后 2 d 注射 VIGS 体系；②CYRSV 接种后马上注射 VIGS 体系，10 d 后取样；③VIGS 体系注射后 2 d 接种 CYRSV，10 d 后取样；④VIGS 体系注射后 5 d 接种 CYRSV，10 d 后取样；⑤VIGS 体系注射后 8 d 接种 CYRSV，10 d 后取样。绝对定量检测对应基因的拷贝数，与相应的对照组（pTRV2）相比，5 种接种模式下对应的 3 种基因拷贝数都明显降低，除 *N* 和 *NSm* 的模式①差和 *NSs* 的模式⑤差异不显著外，其余均显著降低。其中 3 种基因的模式③沉默效率最高，分别为 81.57%、76.52% 和 88.19%。结果表明，VIGS 体系注射后 2 d 再接种 CYRSV，10 d 后 CYRSV 对应基因的沉默效率最高。



数据采用学生 T 检验分析，与对应的 pTRV2 组相比，\*： $P < 0.05$ ，\*\*： $P < 0.01$ ，\*\*\*： $P < 0.001$ 。

Data were analyzed by Student T-test, compared with the corresponding pTRV2 group, \*： $P < 0.05$ ，\*\*： $P < 0.01$ ，\*\*\*： $P < 0.001$ 。

图 5 不同接种模式下本氏烟中 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数

Fig. 5 The copy numbers of CYRSV *N*, *NSs* and *NSm* genes in *Nicotiana benthamiana* under different inoculation modes

## 2.5 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm VIGS 体系在本氏烟和辣椒中的沉默验证

根据以上不同接种模式下 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm VIGS 体系在本氏烟中的沉默效率，我们优先选择先注射 VIGS 体系 2 d 后再接种 CYRSV 的方法在本氏烟和辣椒中进行再次验证，并在注射 CYRSV 接种后 10 d 收集叶片样本进行沉默效率分析。结果图 6 显示，注射了 pTRV2 空载体并摩擦接种 CYRSV 的本氏烟出现明显心叶卷曲和坏死症状，而分别注射了 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm VIGS 侵染液再接种 CYRSV 的本氏烟只出现了心叶卷曲并无坏死症状，且注射了 pTRV2-N 的心叶卷曲程度最小。而注射了 pTRV2 空载体并摩擦接种 CYRSV 的辣椒叶片出现明显的黄化环斑症状，而分别注射了 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm VIGS 的辣椒叶片症状明显减轻（图 6）。结果表明，本文建立的 N, NSs, NSm VIGS 沉默体系成功抑制了 CYRSV 的侵染。

为进一步验证重组病毒载体 pTRV2-N、pTRV2-NSs、pTRV2-NSm 在本氏烟中对 CYRSV 的沉默效果，我们采用实时荧光定量 PCR 技术检测对应本氏烟和辣椒中 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数。如图 7 所示，pTRV1/pTRV2-N、pTRV1/pTRV2-NSs、pTRV1/pTRV2-NSm 农杆菌注射本氏烟和辣椒后，对应基因的拷贝数均显著下调。根据公式计算 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的沉默效率，*N* 基因在本氏烟和辣椒中的沉默效率分别为 82.07% 和 86.63%；*NSs* 基因在本氏烟和辣椒中的沉默效率分别为 87.02% 和 89.22%；*NSm* 基因在本氏烟和辣椒中的沉默效率分别为 94.39% 和 83.43%。结果表明，通过 pTRV2 载体构建 *N*、*NSs*、*NSm* 基因沉默载体沉默效率在 82%~95% 之间，此载体适用于辣椒黄化环斑病毒功能基因沉默载体的构建。

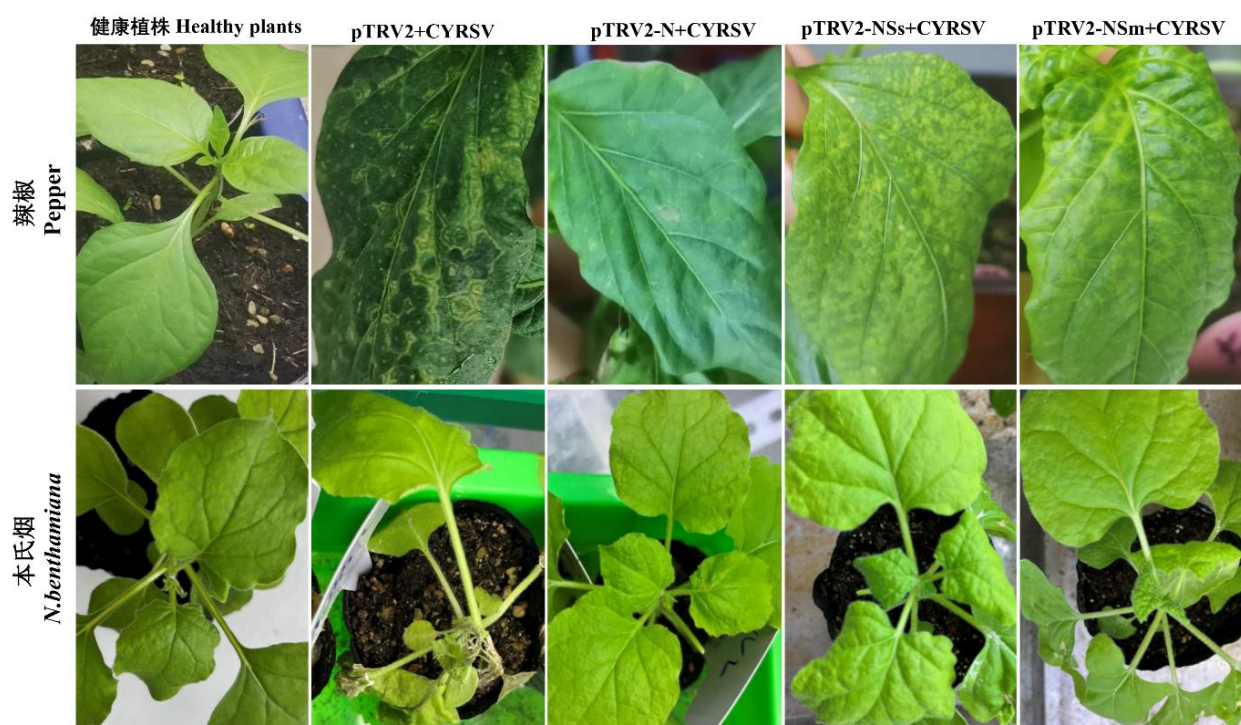
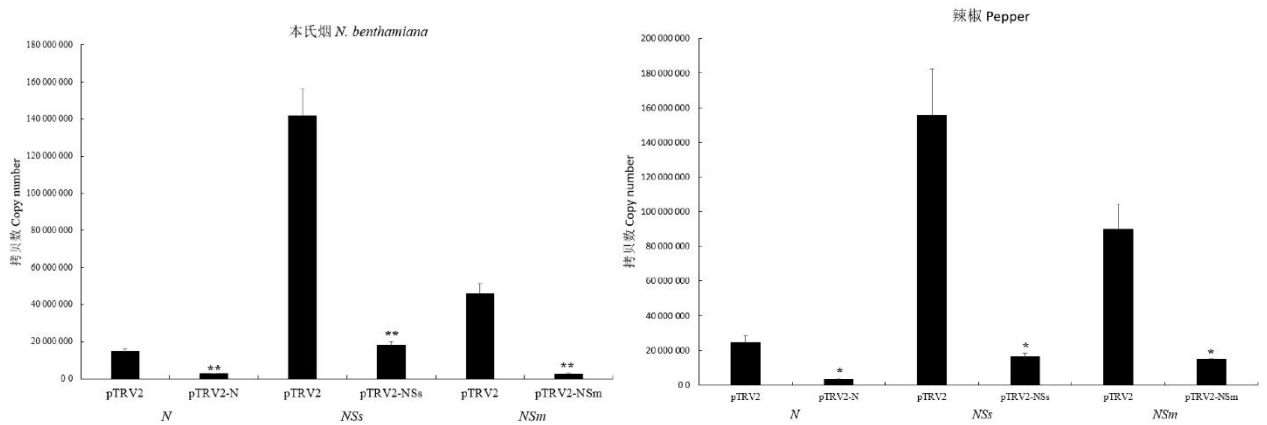


图 6 pTRV2-N, NSs, NSm 和 pTRV2 侵染再接种 CYRSV 后本氏烟和辣椒叶片的症状

Fig. 6 Symptoms of *Nicotiana benthamiana* and pepper leaves infected with CYRSV after inoculation with pTRV2-N, NSs, NSm and pTRV2



数据采用学生 T 检验分析，与对应的 pTRV2 组相比，\*， $P < 0.05$ ，\*\*， $P < 0.01$ 。

Data were analyzed by Student T-test, compared with the corresponding pTRV2 group, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .

图 7 CYRSV *N*、*NSs*、*NSm* 基因在本氏烟和辣椒中的拷贝数

Fig. 7 Copy number of CYRSV *N*, *NSs* and *NSm* genes in *Nicotiana benthamiana* and pepper

### 3 讨论

CYRSV 在云南省红河州地区首次被发现，主要为害辣椒，近两年来，该病毒蔓延到云南省元谋县，给当地的经济作物造成严重损失。采取生物防治和抗病毒育种等方法来防治 CYRSV 病毒已迫在眉睫。为了解 CYRSV 主要蛋白的功能作用，进一步探索 CYRSV 的侵染机制，本研究通过设计并构建高效的 CYRSV 主要功能蛋白 VIGS 沉默体系，运用绝对荧光定量 PCR 技术验证 VIGS 沉默体系的干扰效率，为后续研究 CYRSV 主要功能蛋白的作用提供材料支撑，也为解析 CYRSV 致病机制提供理论支持。

目前，VIGS 技术已广泛且非常成熟地应用于烟草、玉米、水稻、拟南芥、小麦、番茄等多种作物，将作物的内源基因沉默以研究其对植物生长发育及其他功能影响的研究已经十分丰富。但关于植物病毒相关基因的 VIGS 沉默体系研究报道仍然不多，而构建 CYRSV 主要功能蛋白编码基因的 VIGS 沉默体系研究还未见报道。VIGS 沉默体系主要是利用含烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 功能基因的载体 (pTRV1 和 pTRV2) 来实现，目的基因靶片段主要克隆到 pTRV2 载体上，随后与 pTRV1 一起共同侵染植株，达到目的基因表达沉默的作用。本研究将 CYRSV *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因的 300 bp 左右靶片段扩增后构建到 pTRV2 载体上，与 pTRV1 载体共同注射到本氏烟和辣椒叶片中，显著降低了病毒的 *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因的拷贝数，实现了基因沉默的效果。我们设计的靶片段长度均在 300 bp 左右，沉默效率高，这与以往文献报道的将基因全长编码序列及其中 150 bp 左右序列构建到 VIGS 载体上不同，靶片段太小或太长不利于 PCR 扩增，容易造成片段不纯或者碱基突变，并且在侵染植株后容易造成脱靶，导致基因沉默效率不高。

本研究中，我们采用 5 种不同的接种模式来验证 CYRSV 三种基因 VIGS 体系在本氏烟中的沉默效率，其中沉默效率最高的模式是 VIGS 体系注射后 2 d 接种 CYRSV，其次沉默效率较好的模式是 CYRSV 接种后马上注射 VIGS 体系以及 VIGS 体系注射后 5 d 接种 CYRSV，而 CYRSV 接种后 2 d 注射 VIGS 体系和 VIGS 体系注射后 8 d 接种 CYRSV 的模式下沉默效率较低，甚至沉默无显著差异。分析其原因可能是由于 VIGS 体系在植株中发挥作用至少需要 2 d，2 d 后接种病毒效果最佳；而 VIGS 注射时间大于 2 d 或过长再接种病毒，由于 VIGS 体系是瞬时接种，注射时间过长而体内没有病毒的情况下，就会导致 VIGS 在植株内作用不是最佳时候，沉默效率就可能降低；

而 CYRSV 接种后马上注射 VIGS 体系这种模式, 由于病毒和 VIGS 体系前两天都同时处于扩繁和积累的准备阶段, 当 VIGS 到发挥作用的最佳时期时, 病毒也同样处于繁殖最佳时期, 因此沉默效率也会减弱。但先接种病毒后 2 d 注射 VIGS 体系这种模式, 由于病毒先通过 2 d 的积累复制时间, 体内病毒可能已经充分繁殖和活跃, 病毒繁殖正处于上升阶段, 这时候再注射 VIGS 体系的话, 抑制效率就会大大减弱。通过以上摸索实验, 我们选择 VIGS 体系注射后 2 d 再接种 CYRSV 的最佳模式, 进一步在本氏烟和辣椒中进行验证。通过绝对荧光定量 PCR 检测发现 *N*、*NSs* 和 *NSm* 基因在本氏烟中的沉默效率分别是 82.07%、87.02% 和 94.39%, 在辣椒中的沉默效率分别是 86.63%、89.22%、83.43%。邱润霜等 (2020) 报道了先注射 VIGS 载体后接种病毒和先接种病毒后注射 VIGS 载体 2 种方法对 TSWV 的沉默效果, 发现先注射载体后接种病毒的方式要比先接种病毒后注射载体的方式沉默效率高, 这与本文检测结果一致。本文所构建的 *N*、*NSs*、*NSm* VIGS 体系的沉默效率在 82% 到 95% 之间, 再次证明了先注射 VIGS 载体后接种病毒方式的可行性和高效性, 原因可能是 VIGS 载体注射过后会在 48~96 h 复制达高峰, 这时如果接种病毒, 病毒基因表达会在早期就被沉默干扰, 进而影响病毒复制和装配, 达到高效沉默的目的。反之, 如果病毒接种后才注射 VIGS 载体, 可能病毒已经在宿主中进行复制和装配, 产生了许多病毒粒子, 这时候注射 VIGS 载体, VIGS 体系只能沉默部分病毒基因, 或者病毒复制速度大于 VIGS 沉默作用, 进而导致 VIGS 效率不高。此外, 在大田条件下, 病毒的侵染是随机性的, 延续的时间会很长。作为预防措施, 更需要提前进行预防免疫接种, 因此先注射 VIGS 体系后接种病毒是达到病毒高效沉默的因素之一。VIGS 技术的沉默效率在很大的程度上是依赖于寄主植物与病毒间的相互作用, 除此之外 VIGS 技术的沉默效率与寄主的生长环境、病毒积累的环境也紧密相关 (李姣等, 2019)。本研究中的实验都严格在恒温恒湿的温室中进行, VIGS 侵染液吸光度值严格控制在 0.6, 高浓度的菌液会造成植物死亡 (胡锦涛等, 2024)。另外, 病毒在植株内的侵染和复制特点也应该考虑在内, 因为 VIGS 体系沉默植株内源基因和沉默外源病毒基因的时间是会有差异的, 植株内源基因的表达是一直存在的, 一定时间范围内随着 VIGS 体系作用时间延长, 沉默效率可能会越好。但病毒作为外源基因, 其在植株内的复制表达与内源基因是不同的, 而不同种类的病毒, 其基因的表达也不尽相同, 所以本研究中设计的时间点是依据 CYRSV 在植株内侵染复制的特点设计的。选择合适的侵染时间对获得 VIGS 的沉默效率也至关重要, 本研究通过不同接种模式下的沉默效率检测, 确定了适合 CYRSV 病毒基因高效沉默的 VIGS 体系注射模式。本氏烟和辣椒中的症状及沉默效率显示, *N*、*NSs*、*NSm* 基因沉默后, 本氏烟的症状相比对照组是显著减轻, 而 *N* 基因沉默引起的本氏烟心叶卷曲程度最轻, 病症最轻, 提示我们 *N*、*NSs*、*NSm* 基因在 CYRSV 侵染过程中起着重要的作用, 其中 *N* 基因的作用可能最显著最重要, 但仍需要进一步实验来证明这个观点。

尽管 VIGS 技术在植物基因功能鉴定的领域已经取得了巨大的突破, 但依然面临一些和不足和限制, 环境因素对沉默效率的影响比较大, 比如光照条件、温度因子、湿度因素等 (蔡文等, 2017; 张琴琴等, 2020)。虽然 TRV 介导的 VIGS 技术还存在不足和缺点, 但其具有操作步骤简洁、载体构建简单、侵染沉默效率高、研究周期短等优点。随着 VIGS 技术的不断改进, 相信这项技术的应用领域越来越广, 并且越来越受广大研究人员的青睐。本研究成功获得 CYRSV 主要功能蛋白基因 *N*、*Nss* 和 *NSm* 基因的高效 VIGS 沉默及荧光定量 PCR 鉴定体系, 这对了解 CYRSV 功能蛋白的作用、致病机制、复制策略等关键生物学特性具有重要意义。

综上所述, 本实验将设计的 300 bp 左右 *N*、*NSs*、*NSm* 靶片段构建到 pTRV2 沉默载体上, 采用先侵染注射载体后 2 d 再接种病毒 CYRSV 的顺序接种本氏烟。随后应用绝对实时荧光定量 PCR 的分析方法, 检测 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的拷贝数。结果发现 *N* 基因的沉默效率为 82.07%, *NSs* 基因的沉默效率为 87.02%, *NSm* 基因的沉默效率为 94.39%, 揭示了本实验构建的 *N*、*NSs*、*NSm* VIGS 体系在本氏烟中沉默效率高, 且先注射 VIGS 体系后接种病毒的处理方法可以充分发挥 VIGS 体系的沉默作用, 达到高效沉默基因的目的并降低病毒的侵染能力。本研究仅针对 CYRSV 病毒的 VIGS 体系构建, 不同种类的病毒在植物体内复制的上升期有所不同, 繁殖时间也不同,

因此针对不同病毒的 VIGS 体系构建都应该有不同接种模式下的探索。本研究中, CYRSV 中 *N*、*NSs*、*NSm* 基因的 VIGS 构建基因沉默取得成功, 为研究 *N*、*NSs*、*NSm* 基因在病毒致病等方面的功能提供前期材料, 并为 CYRSV 抗病育种和田间绿色防控提供一定的理论依据。

#### 参考文献:

- CAI W, CHEN CM, CHEN GJ, et al., 2017. Application of virus-induced gene silencing technology in research on *Solanaceae* plants function genomic [J]. Journal of Chili Peppers, 15(1): 1-12. [蔡文, 陈长明, 陈国菊, 等, 2017. 病毒诱导基因沉默技术在茄科植物功能基因组学研究中的应用进展 [J]. 辣椒杂志, 15 (1) : 1-12.]
- CHEN KR, XU ZY, YAN LY, et al., 2005. Research progress of tomato spotted wilt virus (Tospovirus) [J]. Chinese Journal of Oil Sciences, 3(2005): 91-96. [陈坤荣, 许泽永, 晏立英, 等, 2005. 番茄斑萎病毒属(Tospovirus)病毒研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 3 (2005) : 91-96.]
- GUI M, GAO X, JIA ZQ, et al., 2022. Molecular identification of *Orthotospovirus* on hot pepper in Yunnan [J]. Plant Protection, 48(4) : 286-292+301. [桂敏, 高雪, 贾志强, 等, 2022. 云南辣椒正番茄斑萎病毒属病毒的分子鉴定 [J]. 植物保护, 48(4): 286-292+301.]
- HAO MY, HANG Q, SHI GY, 2022. Application and prospect of virus-induced gene silencing in crop gene function research [J]. Journal of Agricultural Science and Technology of China, 24(1): 1-13. [郝梦媛, 杭琦, 师恭曜, 2022. VIGS 基因沉默技术在作物基因功能研究中的应用与展望 [J]. 中国农业科技导报, 24 (1) : 1-13.]
- HOU QM, ZHANG L, HE XQ, et al. 2015. Experimental design and practice for plant gene function analysis by VIGS [J]. Experimental Technology and Management, 32(9): 191-193. [侯巧明, 张立, 贺新强, 等, 2015. 病毒诱导的基因沉默技术实验教学设计和实践 [J]. 实验技术与管理, 32 (9) : 191-193.]
- HU JY, LIU GZ, CHEN L, et al., 2024. Construction of virus-mediated genetic transformation system of *Camellia sinensis* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 51(11): 2710-2724. [胡锦瑜, 刘桂芝, 陈兰, 等, 2024. 烟草脆裂病毒介导的茶树 VIGS 体系的构建 [J]. 园艺学报, 51 (11) : 2710-2724.]
- LI J, YU ZX, FENG BM, 2019. Advances in research and application of virus induced gene silencing in plants [J]. Molecular Plant Breeding, 17(5): 1537-1542. [李皎, 于宗霞, 冯宝民, 2019. 植物中病毒诱导基因沉默技术的研究与应用进展 [J]. 分子植物育种, 17 (5) : 1537-1542.]
- LIU Y, LI F, LI YY, et al., 2019. Identification, distribution and occurrence of viruses in the main vegetables of China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 52(2): 239-261. [刘勇, 李凡, 李月月, 等, 2019. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势 [J]. 中国农业科学, 52 (2) : 239-261.]
- QIU RS, ZHAO LH, ZHANG XM, et al., 2020. Construction of VIGS vector containing N gene derived from tomato spotted wilt orthotospovirus [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 50(6): 766-773. [邱润霜, 赵立华, 张晓明, 等, 2020. 番茄斑萎病毒 N 基因的 VIGS 载体构建 [J]. 植物病理学报, 50 (6) : 766-773.]
- REN HZ, LI DY, YU YT, et al., 2024. Research advances of strategies to engineer VIGS vectors and its application in plants [J]. Acta Horticulturae Sinica, 51(7): 1455-1473. [任恒泽, 李丹莹, 余亚婷, 等, 2024. 植物 VIGS 载体构建策略研究与应用进展 [J]. 园艺学报, 51 (7) : 1455-1473.]
- WEI ZX, SUN H, XIANG YT, et al., 2022. Application of virus-induced gene silencing in *legumes* [J]. Chinese Journal of Oil Sciences, 44(3): 497-502. [魏正欣, 孙虎, 向艳涛, 等, 2022. 病毒诱导基因沉默技术在豆科植物中的应用 [J]. 中国油料作物学报, 44 (3) : 497-502.]
- YU HL, JIN Y, LIU J, et al., 2020. Occurrence and development trend of pepper virus diseases in China-Based on main pepper producing areas Investigation in 2018 and 2019 [J]. Chinese Vegetables,

- 9(2020): 25-30. [于海龙, 靳远, 刘婧, 等, 2020. 我国辣椒病毒病发生情况及发展趋势—基于2018年和2019年辣椒主产区的调查 [J]. 中国蔬菜, 9 (2020) : 25-30.]
- YANG TT, ZHAO LH, QIU RS, et al., 2022. Construction of 2 non-structural proteins VIGS system of TSWV [J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Science), 42(2) : 151-156. [杨婷婷, 赵立华, 邱润霜, 等, 2022. 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), 42 (2) : 151-156.]
- ZHANG ZK, DING M, FANG Q, et al., 2004. The preliminary study of the occurrence and distribution of Tospovirus in Yunnan [J]. Southwest Chinese Journal of Agricultural Sciences, S1(2004): 163-168. [张仲凯, 丁铭, 方琦, 等, 2004. 番茄斑萎病毒属(Tospovirus)病毒在云南的发生分布研究初报 [J]. 西南农业学报, S1 (2004) : 163-168.]
- ZHANG LY, 2022. Study and application of virus-induced gene silencing technology (VIGS) in garden plants [J]. Henan Forestry Science and Technology, 42(2) : 32-34. [张丽英, 2022. 病毒诱导的基因沉默技术 (VIGS) 在园林植物中的研究与应用 [J]. 河南林业科技, 42 (2) : 32-34.]
- ZHANG ZK, ZHENG KY, ZHAO LH, et al., 2021. Occurrence, distribution, evolutionary relationships, epidemiology, and management of orthotospoviruses in China [J]. Frontiers in microbiology, 12: 686025.
- ZHANG QQ, JI ZL, ZHU F, 2020. Application advance of viral-induced gene silencing technology in *Dicotyledonous* [J]. Henan Agricultural Sciences, 49(2): 1-8. [张琴琴, 纪兆林, 朱峰, 2020. 病毒诱导的基因沉默技术在双子叶植物中的应用研究进展 [J]. 河南农业科学, 49 (2) : 1-8.]
- ZHENG KY, CHEN TC, WU K, et al., 2020. Characterization of a new orthotospovirus from chilli pepper in Yunnan province, China [J]. Plant disease, 104(4): 1175-1182.
- ZHANG J, WU K WANG TT, et al., 2025. First report of chilli yellow ringspot virus infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) in China [J]. Plant Disease, Online.