

病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术及其在大豆基因功能研究和育种中的应用潜力

王爽^{1,2} 郭兵福² 郭勇² 张丽娟² 金龙国² 杨慧² 邱丽娟²

(1. 东北农业大学 农学院 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程 北京 100081)

摘要: 病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是植物体抵抗病毒侵染的一种自然防御机制,近年来已发展成为一种基因功能研究的有效手段。与突变体筛选、转基因、基因敲除等技术相比,VIGS技术因具有周期短、成本低、可迅速观察表型等优点而被广泛应用于基因的功能鉴定。文章对VIGS技术的分子机理、病毒载体系统、稳定遗传VIGS植株的获得策略及其在大豆中的应用等内容进行了综述并对今后的发展趋势进行了讨论。

关键词: 病毒诱导的基因沉默; VIGS; 病毒载体; 功能基因; 育种

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0536

Virus-induced Gene Silencing and Its Usage in Soybean Functional Genomics

WANG Shuang^{1,2}, GUO Bing-fu², GUO Yong², ZHANG Li-juan², JIN Long-guo², YANG Hui², QIU Li-juan²

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI) / MOA Key Lab of Soybean Biology (Beijing), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Virus-induced gene silencing is the innate plant defense system against intracellular viral proliferation and extracellular viral movement. VIGS is nowadays widely used in plant genetics for gene knockdown due to its ease of use and the short time required to generating phenotypes. In this paper, the molecular mechanism of VIGS and the VIGS virus vector system was reviewed. The strategy to obtain stable VIGS plants and the application of VIGS has also been discussed.

Keywords: Virus-induced gene silencing; VIGS; Virus vector; Functional gene; Breeding

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是植物体内普遍存在的一种抵御细胞内病毒增殖和细胞外病毒侵染的遗传免疫机制^[1],其基本分子机理为RNA介导的基因沉默,可以分为转录水平的基因沉默和转录后水平的基因沉默两种。1995年,Kumagai等^[2]利用烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)构建了VIGS载体并首次成功实现了对烟草内源八氢番茄红素脱氢酶基因(phytoene desaturase, PDS)的沉默,开启了病毒介导基因沉默研究的先河。自此,VIGS技术发展迅速,不仅在本氏烟、拟南芥等模式植物上成功应用,在水稻、玉米、小麦、大豆等作物上均有成功的报道。需要强调指出的是,部分病毒介导的基因沉默亦可获得表型可遗传的VIGS植株,对功能基因研究及分子育种利用具有重要的意义。因此,病毒诱导的基因沉默技术有望改善大豆因遗传转化困难而导致的基因功能研究缓慢的现状,为大豆基因功能研究、品种性状改良提供了新的思路。

1 VIGS技术的分子机理

VIGS是指利用携带靶基因cDNA片段的病毒载体侵染植株,随着病毒在植物体内的复制和转录,携带的cDNA片段特异性地诱导序列同源基因mRNA降解或启动子的甲基化修饰,进而引发植物表型或生理指标的变化,实现对靶基因的功能验证^[3]。VIGS技术主要包括沉默信号的产生、目标基因的沉默、信号的放大和信号的传播4个环节^[4],在整个过程中起关键作用的物质主要有4种,分别是RNA聚合酶、RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP)、Dicer-like酶、RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)^[5]。RNA诱导的沉默复合体含有Argonaut蛋白,该蛋白具有核酸内切酶活性,能切割目标mRNA,阻断翻译的进行,进而沉默基因的表达。

1.1 沉默信号的产生和目标基因的沉默

当携带cDNA的病毒载体侵染植物后,在RNA

收稿日期:2015-12-04

基金项目:转基因新品种培育重大专项(2014ZX08004-001)。

第一作者简介:王爽(1990-),女,硕士,主要从事大豆转基因研究。E-mail: 675659474@qq.com。

通讯作者:邱丽娟(1963-),女,研究员,博导,主要从事大豆基因资源挖掘与利用工作。E-mail: qiulijuan@caas.cn。

聚合酶的作用下将 cDNA 转录成大量的单链 RNA (single stranded RNA, ssRNA)。这些单链 RNA 通过自身折叠或者在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶作用下形成双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 形式的中间体^[6]。中间体 dsRNA 是 VIGS 的关键激发子, 而 Dicer-like 酶则是 VIGS 传感器, 逐步将 dsRNA 切割加工成 21 ~ 24 nt 的病毒小干扰 RNA (virus small interfering RNAs, vsRNA)^[7]。这些 vsRNAs 以单链形式与 RISC 结合, 作为向导链, 引导 RISC 复合物特异地与细胞质中的同源 RNA 结合, 实现对其的切割和同源降解, 阻碍翻译的继续进行, 该分子机理属于转录后水平基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。而 RISC 与嘧啶甲基转移酶 (cytosine methyltransferase, DRM) 结合, 再与细胞核内同源目标靶基因结合, 使其启动子甲基化, 抑制基因表达则属于转录水平的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS)^[8]。

1.2 沉默信号的传播和放大

病毒侵染植株后会以侵染点为中心向整株扩散, 病毒在植物体中的运动是由病毒基因编码的运动蛋白与寄主成分相互作用的主动运动过程, 在病毒复制与扩散过程中, 运动蛋白与植物细胞内质网、高尔基体、细胞骨架、胞间连丝发生作用, 并受细胞果胶甲基酯酶、包含体、 β -1, 3-葡聚糖酶、磷酸化等因素的影响, 形成植物体内遗传物质系统性运输的模式^[9]。沉默信号以 vsRNA 的形式通过胞间连丝在细胞间进行传播, 能够在细胞间进行传播的 vsRNA 主要为 21 nt 大小的 vsRNA, 传播距离大约为 10 ~ 15 个细胞^[10]。RDRP 在沉默信号放大的过程中起主导作用, 病毒的 ssRNA 不具备宿主细胞转录本的 5' 端加帽结构和 3' 端 Poly-(A) 结构, 而 RDRP 能够感知这种缺失结构^[11], 直接或间接的与之结合, 并在目标转录本的 3' 端开始合成 RNA^[12]。

2 病毒载体的构建及在大豆中的应用

2.1 病毒载体的构建

选择适宜的病毒构建 VIGS 系统是利用病毒介导基因沉默进行基因功能验证的前提。植物病毒的多样性和病毒与作物互作的多样性, 是导致 VIGS 载体的利用具有一定局限性的主要原因。应用于 VIGS 研究的病毒应满足以下条件: 首先, 病毒扩散的程度应满足试验要求且病毒症状的严重程度不影响目的基因表型的观察; 其次, 应用于 VIGS 构建的病毒应具有一定的沉默效率且病毒本身的反沉默系统不影响表型的观察。且在构建病毒载体时, 一般需要考虑以下几个方面: (1) 要选择合适的插

入位点, 外源基因插入后, 不能产生插入效应, 影响病毒本身的复制和移动; (2) 在载体构建时, 插入目的基因片段大小要适中, 不同病毒对插入片段大小的要求不同, Rodrigo 等研究表明, 病毒载体构建时, 插入基因片段长度不能太长, 控制在 200 ~ 350 bp 时易达到较好的沉默效果^[13], 插入片段过大时, 影响病毒在植物体内的扩散或导致目的片段的丢失, 从而影响沉默效率^[14]; (3) 在构建 VIGS 载体时, 选择合适的目的基因区域插入病毒载体。若是单拷贝基因, 其 ORF 中的任何区域均可作为片段的插入区域, 若是多拷贝基因或家族基因, 则要根据研究目的选择插入基因区域, 如果两基因的同源性达到 85% 以上, 在 VIGS 时可能同时被沉默, 因此在专一化沉默基因家族中的某一个基因时, 应选择非保守区域或基因的非翻译区 (UTR) 来区别高度保守的基因。如果为了克服功能冗余同时沉默家族基因中功能相似的基因, 则可选择基因的高度保守区^[15]。

2.2 病毒载体的应用

VIGS 中应用的于植物的病毒主要有 3 种, 分别是负链 RNA 病毒、单链 DNA 病毒和卫星病毒。随着研究的深入和 VIGS 分子机理的日渐明晰, 不断有新的、高效的病毒载体系统构建的报道。自 2004 年起, 已有多个 VIGS 病毒载体在豆科作物基因功能研究中获得成功应用^[16], 包括菜豆荚斑病毒 (bean pod mottle virus, BPMV)、苹果潜隐球状病毒 (apple latent spherical virus, ALSV) 和黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 等病毒系统, 在大豆 VIGS 中都有成功应用的实例。

2.2.1 RNA 病毒载体的应用 RNA 病毒是最早采用也是目前应用最多的载体病毒种类。Constantin^[17]等最早对豌豆枯叶病毒 (pea early browning virus, PEBV) 进行了探索, 他们将 *PDS* 基因的 cDNA 片段插入到该病毒载体的单链 RNA2, 并侵染豌豆, 实现了 *PDS* 基因的沉默。该病毒载体具有不影响豌豆开花、结荚成熟以及与根瘤菌共生形成根瘤等优点, 具有在豆科作物上广泛应用的潜力。目前, 已利用 RNA 病毒载体实现了对多种类型的大豆基因的功能鉴定。其中, 抗性相关基因及系统免疫相关基因的功能鉴定是应用的热点之一, Kandoth 等^[18]详细阐述了一个 SCN-BPMV-VIGS 作用系统, 并利用该 VIGS 系统沉默了大豆胞囊线虫抗性基因 SHMT, 沉默效率为 65% ~ 74%, 为根部共生菌抗性相关基因功能鉴定提供了参考。Cooper 等^[19]利用菜豆荚斑病毒系统沉默了 *Rpp1* 基因, 使大豆丧失根腐病免疫功能, 该结果有助于 *Rpp1* 基因调控的根

腐病免疫途径及相关基因的研究和对大豆防御系统的认知; Chunquan 等^[20]利用大豆花叶病毒构建了82个病毒载体,鉴定了5个与抗花叶病毒有关的目的基因和两个转录本,为大豆花叶病毒抗病途径相关基因的研究提供了新的视角。同时,发育相关基因的功能鉴定也取得一定的进展,Sha 等^[21]利用大豆甲硫氨酸合成酶基因 *Gmms* 的同源序列构建烟草脆裂病毒侵染载体处理烟草,导致烟草早衰,证明了甲硫氨酸在光周期调控中起重要作用,为进一步阐述大豆光周期机理打下基础。郝荣华^[22]利用大豆花型调控基因构建了 *GmTCP1-VIGS*、*GmTCP2-VIGS*、*GmTCP4-VIGS* 三个病毒载体,侵染大豆,受侵染的大豆植株约有 10% ~ 32.5% 的花器官发生了变化,由旗瓣变成为闭合筒状结,为这3种基因参与旗瓣发育和细胞分裂过程提供了证据。此外,还利用 VIGS 技术鉴定了代谢途径相关的功能基因,如 Nagamatsu 等^[23]利用黄瓜花叶病毒构建 *CHS*(查尔酮合成酶)-VIGS 病毒系统,成功沉默查尔酮合成酶基因,使棕色种皮的豆子变为黄色种皮,该试验为生物合成相关途径的基因功能验证提供依据和参考。利用 RNA 病毒也实现了在不同组织和发育时期的应用, Juvalle 等^[24]利用菜豆荚斑驳病毒建立了时间和空间上的基因沉默体系,在叶片、茎、花和根等组织中均实现了 GFP 的沉默。沉默的效果在不同组织具有差异性,在叶片和花中几乎是完全沉默,茎中次之、根中最弱,为在不同组织中的反向遗传学研究提供了参考;2009年, Yamagishi 等^[25]利用苹果潜隐球状病毒在大豆种子和萌发阶段实现了 *PDS* 基因的沉默,拓宽了 VIGS 技术的应用范围。

2.2.2 DNA 病毒载体的应用 DNA 病毒具有载体系统构建简单,无需体外转录及操作难度低等优点,逐渐引起研究者的重视。1998年,第一例 DNA 病毒载体即基于双生病毒番茄金色花叶病毒(*toma-to golden mosaic virus*, TGMV)的 VIGS 体系成功建立,并证明了附加 DNA 能引起同源的内源 DNA 的沉默^[26],打开了 DNA 病毒载体应用的大门。随后,非洲木薯花叶病毒(*african cassava mosaic virus*, ACMV)载体系统^[27]、棉花皱叶病毒(*cotton leaf crumple virus*, CLCrV)载体系统^[28]等 DNA 病毒载体系统相继建立并应用,拓宽了病毒载体的种类,为病毒诱导的基因沉默技术的成熟奠定了坚实的基础,但目前还未有 DNA 病毒载体应用于大豆中的实例。

2.2.3 卫星病毒载体的应用 卫星病毒(*satellite virus*)是一类基因组缺损、需要借助辅助病毒,才能复制和表达,并完成增殖的亚病毒。它不能单独存

在,常伴随着其他病毒一起出现。Gossele 等^[29]首次利用 TMV U2 株系卫星病毒 STMV 构建 VIGS 载体,并成功实现了对烟草多个内源基因的沉默,同时研究表明,卫星病毒 STMV 构建的 VIGS 载体与单独的 RNA 病毒载体系统或单独的 DNA 病毒载体系统相比,具有更强的沉默基因的能力,因而具有较高的研究价值和应用前景,但目前还未见此病毒应用于大豆中的报道。

3 持久性 VIGS 植株获得策略

前人研究结果表明,可遗传的 VIGS 植株不仅拓宽了功能基因的研究范围,且高代的 VIGS 植株普遍具有较高的沉默效率。VIGS 分为转录水平的基因沉默(TGS)和转录后水平(PTGS)的基因沉默两种类型。这两种类型的 VIGS 均可以产生沉默性状可遗传的植株,但二者机理不同,在后代的选择方法上亦存在差异。

3.1 可遗传的 TGS 植株获得策略

转录水平的基因沉默即目标基因启动子甲基化引发的 TGS 产生的表型变化是可以遗传的,属于表观遗传^[30]。病毒载体侵染植株后,在当代选择有沉默表型且无病毒受害症状的植株进行留种,对于有表型沉默性状但携带病毒的植株可以进行脱毒处理后再进行留种,每一世代均重复利用上述方法进行选择,最终可获得沉默性状可以遗传且不携带病毒的 VIGS 植株。另外,也可利用具有沉默性状并无病毒受害症状植株的组织进行组织培养亦可最终获得稳定的 VIGS 植株。1999年, Jones 等^[31]报道了关于 TGS 的表观遗传现象,利用马铃薯 X 病毒在实现了携带 *GFP* 基因的烟草植株 *GFP* 基因的沉默,且可遗传至后代,但其沉默效率低,小于 10%。2011年, Kanazawa 等^[32]通过黄瓜花叶病毒载体对目标基因启动子的甲基化,实现了矮牵牛查尔酮合成酶基因(*CHS-A*)的沉默,改变了花色,且后代植株继续表现为该基因的沉默表型,沉默效率约为 20% ~ 30%。迄今为止,只发现两种病毒,马铃薯 X 病毒和黄瓜花叶病毒,通过 VIGS 可成功获得靶基因沉默表型可遗传的 VIGS 植株,目前未在大豆中获得该种类型的植株。

3.2 可遗传的 PTGS 植株获得策略

部分 VIGS 载体病毒诱导的 PTGS 能够通过种子传递给后代植株^[33],目前已有4种病毒载体可获得遗传的 VIGS,且沉默率一般随世代的增加而增加。与 TGS 不同的是,在选择植株时,PTGS 是选择具有沉默性状且带病毒的植株进行繁殖,最终可获得沉默性状可以遗传但是携带病毒载体的植株。

但是可以通过热击^[34]或者冷冻疗法^[35]得到脱毒植株,并且这种脱毒作用会逆转目标基因的沉默效应,得到性状恢复的植株,有利于基因功能的验证。

最早是1997年Wang等^[36]利用豌豆布郎宁早期病毒(pea early browning virus,PEBV)载体侵染豌豆的胚胎组织,并通过种子遗传给后代,其沉默率为50%。Bruun等^[37]将PDS基因片段插入到大麦条纹花叶病毒载体中,证明了大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus,BSMV)介导的VIGS能够在大麦和小麦中至少传递6代,且沉默效率随着世代的递增而递增,第一代11%,而第三代及以后各世代沉默率均高达100%。利用烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus,TRV)能够在本氏烟和番茄中诱导可遗传的PTGS^[38]。值得强调指出的是,Yamagishi等^[39]利用苹果潜隐球形病毒(apple latent spherical virus,ALS)实现了VIGS在大豆中的遗传,第一代的沉默效率为33%,下一代的沉默效率为55%以上,为获得非转基因且表型遗传的大豆植株提供参考。

4 VIGS 技术在大豆中的应用展望

随着栽培大豆基因组测序的完成^[40]、野生大豆泛基因组的构建^[41]以及大豆种质资源重测序数据的不断完善^[42-43]。筛选优良性状基因及功能基因验证等相关研究已成为大豆分子生物学研究的热点。大豆是古四倍体,遗传变异程度低、基因组较大且复杂,染色体小而难进行细胞遗传研究,导致基因功能研究进展较慢。目前大豆基因功能研究的手段还相对缺乏,一些完善的基因功能研究手段很难在大豆中应用^[44],如农杆菌介导的大豆转基因方法,存在转化效率较低、周期较长等缺点;基因敲除技术技术难度较高;近年来新兴的基因编辑技术如ZFN、TALENs和CRISPR等在大豆中也具有一定的应用,但亦存在体系不够完善,技术难度较高等问题。VIGS技术因其具有周期短,方法简单易操作,可调控不同类型功能基因的表达等优点,为大规模测试大豆基因组中不同基因的功能创造了条件,具有更广阔的应用前景。

遗传转化效率低、转基因产品审定年限长及转基因安全问题是限制转基因大豆发展的重要因素,而VIGS技术这种非转基因但能够稳定遗传的特性具有极高的应用价值,或将在植物基因工程育种中具有较好的应用前景,例如通过VIGS技术沉默大豆优良性状负调控基因、代谢途径的关键酶基因,可能实现大豆重要经济性状的改良,进而应用于培育非转基因但抗性增强的改良大豆品种。

此外,VIGS技术可能为大豆病虫害防治带来新的思考和方法,根据病毒诱导基因沉默的机理,VIGS技术不仅可以作用于植物内源基因,也可能实现寄主体内病毒、真菌、线虫等病原基因的沉默,进而有效防控真菌、线虫等病害^[45],具有良好的应用前景。

随着VIGS机制的深入解析及分子生物学技术的进一步发展,若能有效克服VIGS存在的缺陷和不足,如基因沉默不完全、表型及沉默效率不稳定、表型观察易受病毒侵染的症状影响等,建立更为精准、高效和高通量的VIGS体系,将有助于加速大豆功能基因的发掘和育种利用。

参考文献

- [1] Baulcombe D. Viruses and gene silencing in plants[J]. Archives of Virology, 1999, 15: 189-201.
- [2] Kumagai M H, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1995, 92(5): 1679-1683.
- [3] Godge M R, Purkayastha A, Dasgupta I, et al. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(2): 209-219.
- [4] Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: A touch of robustness and versatility[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(4): 464-470.
- [5] Annette B, Lange M. VIGS-genomics goes functional[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(1): 1-4.
- [6] Donaire L, Baraias D, Martinez-Garcia B, et al. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs[J]. Journal of Virology, 2008, 82(11): 5167-5177.
- [7] Xie Z, Johansen L K, Gustafson A M, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants[J]. PLoS Biology, 2004, 2(5): 642-652.
- [8] Liave C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(12): 701-707.
- [9] 韩国辉, 廖祥儒, 史海水, 等. 运动蛋白介导的病毒在植物体内的传播[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 587-592. (Han G H, Liao X R, Shi H S, et al. Transportation of plant viruses mediated by movement proteins[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2004, 12(6): 587-592.)
- [10] Tae K H, Mohammad N U, Yeonggil R, et al. Cell-to-cell trafficking of RNA and silencing through plasmodesmata[J]. Protoplasma, 2011, 248(1): 101-116.
- [11] Curaba J, Chen X. Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(6): 3059-3066.
- [12] Voinnet O. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(7): 317-328.
- [13] Rodrigo G, Carrera J, Jaramillo A, et al. Optimal viral strategies

- for by passing RNA silencing[J]. *Journal of The Royal Society Interface*, 2011, 8(55): 257-268.
- [14] Liu E W, Jonathan E P. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus[J]. *Plant Methods*, 2008, 4: 5(1): 69-73.
- [15] Peele C, Jordan C V, Muanqsan N, et al. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors[J]. *Plant Journal*, 2001, 27(4): 357-366.
- [16] Pflieger S, Richard M S, Blanchet S, et al. VIGS technology: An attractive tool for functional genomics studies in legumes [J]. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(12): 1234-1248.
- [17] Constantin G D, Krath B N, Macfarlane S A, et al. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species [J]. *The Plant Journal*, 2004, 4: 622-631.
- [18] Kandoth P K, Heinz R, Yeckel G, et al. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max* [J]. *Bmc Research Notes*, 2013, 6: 225.
- [19] Cooper B, Campbell K B, McMahon M B, et al. Disruption of *Rpp1*-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing[J]. *Plant Signal and Behavior*, 2013, 8(12): e27543.
- [20] Zhang C Q, Sehiza G, Steven A W, et al. The requirement of multiple defense genes in soybean Rsv-mediated extreme resistance to *soybean mosaic virus* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(10): 1307-1313.
- [21] Sha A H, Chen Y H, Shan Z H, et al. Identification of photoperiod-regulated gene in soybean and functional analysis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Indian Academy of Sciences*, 2014, 93(1): 43-51.
- [22] 郝荣华. 大豆花型发育分子机制的初步研究[D]. 山东: 山东师范大学, 2012: 76-79. (Hao R H. Preliminary investigation on molecular mechanism controlling floral symmetry in soybean [D]. Shandong: Shandong Normal University, 2012: 76-79.)
- [23] Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, et al. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(6): 778-790.
- [24] Juvalle P S, Hewezi T, Zhang C, et al. Temporal and spatial bean pod mottle virus-induced gene silencing in soybean [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(9): 1140-1148.
- [25] Yamagishi N, Yoshikawa N. Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with apple latent spherical virus vectors [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(1-2): 15-24.
- [26] Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(1): 91-100.
- [27] Fofana I. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4): 613-624.
- [28] Tuttle J R, Dominique R. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 41-50.
- [29] Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, et al. SVISS—A novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(5): 859-866.
- [30] Kanazawa A, Shimura H, Otagaki S, et al. Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(1): 156-168.
- [31] Jones L, Hamilton A J, Voinnet O, et al. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(12): 2291-2302.
- [32] Kanazawa A, Inaba J, Kasai M, et al. RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: A potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits [J]. *Plant Signaling Behavior*, 2011, 8: 1090-1093.
- [33] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Caveat of RNAi in plants: The off-target effect RNAi and plant gene function analysis [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 744: 13-25.
- [34] Wang Q, Wilmer J C, Minna-Liisa R, et al. Combined chemotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: Relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(7): 237-250.
- [35] Wang Q. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method [J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(3): 119-122.
- [36] Wang D, Maule A J. Contrasting patterns in the spread of two seed-borne viruses in pea embryos [J]. *Plant Journal*, 1997, 11(6): 1333-1340.
- [37] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(7): 797-806.
- [38] Senthil-Kumar M, Kirankumar S M. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(7): 797-806.
- [39] Yamagishi N, Yoshikawa N. Virus-induced gene silencing of endogenous genes and promotion of flowering in soybean by apple latent spherical virus-based vectors [J]. *Soybean -Molecular Aspects of Breeding*, 2011: 43-56.
- [40] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature* 2010, 463(7278): 178-183.
- [41] Li Y, Zhou G, Ma J, et al. De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 1045-1052.
- [42] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the paleopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183.
- [43] Ying H L, Shan C Z, Jian X M, et al. Molecular footprints of domestication and improvement in soybean revealed by whole genome re-sequencing [J]. *BMC Genomics* 2013, 14: 579.
- [44] Kachroo A, Ghabrial S. Virus-induced gene silencing in soybean [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 894: 287-297.
- [45] Nunes C C, Dean R A. Host-induced gene silencing: A tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(5): 519-529.