

水稻草矮病毒侵染的水稻根系差异蛋白鉴定

丁新伦 谢荔岩 张洁 吴祖建*

(福建农林大学 植物病毒研究所/福建省植物病毒重点实验室, 福州 350002; * 通讯联系人, E-mail: wuzujian@126.com)

Identification of Differentially Expressed Proteins in Roots of Rice (*Oryza sativa*) Infected with *Rice grassy stunt virus*

DING Xin-lun, XIE Li-yan, ZHANG Jie, WU Zu-jian*

(Key Laboratory of Plant Virology of Fujian Province/Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; * Corresponding author, E-mail: wuzujian@126.com)

DING Xinlun, XIE Liyan, ZHANG Jie, et al. Identification of differentially expressed proteins in roots of rice (*Oryza sativa*) infected with *Rice grassy stunt virus*. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(4): 356–362.

Abstract: In order to find the proteins related to root maldevelopment caused by *Rice grassy stunt virus* (RGSV), elucidate the mechanism of root maldevelopment and better understand the molecular basis of interaction between RGSV and host rice, 2D-DIGE coupled with MALDI-TOF-MS was used to screen and identify differentially expressed proteins between RGSV-infected and RGSV-uninfected rice roots. The acquired proteins were further analyzed using GoMiner programs and KEGG pathway database. The results showed that 56 protein spots (differential ratio > 2) were differentially expressed, including 34 up-regulated and 22 down-regulated protein spots. Among them, 27 differentially expressed protein spots which belonged to 25 proteins were identified, and these proteins were mainly involved in 14 biological processes, 10 molecular functions and 12 KEGG pathways.

Key words: *Rice grassy stunt virus*; rice roots; differentially expressed proteins; 2D-DIGE; MALDI-TOF-MS

丁新伦, 谢荔岩, 张洁, 等. 水稻草矮病毒侵染的水稻根系差异蛋白鉴定. 中国水稻科学, 2016, 30(4): 356–362.

摘要: 为鉴定与水稻草矮病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV)侵染引起的水稻根系发育不良的相关蛋白, 解析根系发育不良症状的形成机理以及水稻草矮病毒与水稻互作的分子机制, 采用双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)结合基质辅助激光解析串联飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)对 RGSV 侵染水稻后根系的差异表达蛋白进行分离和鉴定, 并对鉴定的差异表达蛋白进行 GO 聚类分析和 KEGG 生物通路注释。结果表明, 差异倍数大于 2 的蛋白质点有 56 个, 其中, 表达丰度升高的点有 34 个, 表达丰度下降的点有 22 个; 质谱成功鉴定出 27 个蛋白质点, 分属于 25 种蛋白质。GO 聚类分析表明差异表达蛋白涉及 14 个生物学过程, 在生物功能上分属 10 类。细胞组件分析显示差异表达蛋白定位于不同的细胞部位。KEGG 通路分析显示差异蛋白参与了 12 个生物通路。

关键词: 水稻草矮病毒; 水稻根系; 差异表达蛋白; 双向荧光差异凝胶电泳; 基质辅助激光解析串联飞行时间质谱技术

中图分类号: S435.111.4; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)04-0356-07

植物受病毒侵染后不仅地上部会表现各种症状, 而且地下根系的发育也会受到影响。病毒侵染导致根系发育异常主要表现出根变短、根细弱、不定根减少、根质量下降、褐根多和易拔起等症状。如南方水稻黑条矮缩病毒(*Southern rice black-streaked dwarf virus*, SRBSDV)导致水稻根系不发达, 须根少而短, 严重时根系呈黄褐色^[1]。黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)引起烟草和辣椒根系变短, 根质量下降^[2]。大豆花叶病毒(*Soybean*

mosaic virus, SMV)可使感病品种大豆根系生长量减少 57%~60%^[3], 马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)甚至可导致根系坏死^[4]。尽管病毒侵染引起寄主根系发育异常的现象已引起关注, 但已有报道多是对其症状的描述, 而有关病毒引起根系症状异常的分子机制研究则较少, 机理也不清楚。王煜炜等^[5]研究表明黄瓜花叶病毒(CMV-Fny-satT1)和番茄不孕病毒(TAV-Bj)侵染番茄引起与根系发育相关miR164的含量升高, 而其靶标 NAC1mRNA

收稿日期: 2015-12-28; 修改稿收到日期: 2016-05-23。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31301640); 国家科技支撑计划资助项目(2012BAD19B03)。

含量明显降低,最终导致侧根数量大大减少。

水稻草矮病毒,又称水稻草状矮化病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV),属于纤丝病毒属(*Te-nuivirus*)。该病毒侵染引起的水稻草矮病(Rice grassy stunt)主要发生在热带和亚热带稻区,最早于1964年在菲律宾被首先确认,随后在中国、日本、南亚及东南亚的一些国家陆续被报道。我国的广东、广西、海南、福建和台湾等地也有发生的报道^[6]。RGSV侵染除了引起水稻植株严重矮化和分蘖增多等地上症状外,还严重干扰根系的发育,表现为根系不发达、根长变短、根质量减轻、不定根减少等症状。丁新伦等^[7]研究发现,RGSV侵染水稻后可引起根系发育相关基因 *OsPHR2* 和 *Cr1-5* 基因下调表达。

比较蛋白质组学技术已成为生命科学领域十分有效的研究手段,可以检测参与 RGSV 和寄主水稻互作的多个蛋白质。本研究采用双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)结合基质辅助激光解析串联飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)对 RGSV 侵染的水稻根系在蛋白质表达水平的变化进行了分析,旨在鉴定与 RGSV 侵染引起水稻根系发育不良的相关蛋白,结果将有助于解析根系发育不良症状的形成机理,也为进一步理解 RGSV 与水稻互作的分子机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

RGSV 毒源和昆虫介体无毒褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)均由福建农林大学植物病毒研究所保存。供试水稻为杂交水稻汕优 63。DIGE 试剂盒、IPG 胶条(24 cm, pH 4~pH 7)均购自美国 GE 公司;甲醇和丙酮等有机试剂购自美国 Thermo Fisher 公司;交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)购自美国 BBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 取样

将昆虫介体褐飞虱在 RGSV 病株上饲毒 72 h,并转饲于水稻健株上度过循环期,随后接种汕优 63 幼苗,传毒 72 h,接种后 30 d 取样。经无毒褐飞虱取食后的汕优 63 植株作为对照。8~10 株水稻根系混合取样,RGSV 处理和对照各设 3 次重复。样品在液氮中速冻后,保存于-80℃下。

1.2.2 蛋白质的提取与纯化

水稻根系蛋白的提取与纯化参照 Carpentier

等^[8]的方法,略有修改。取 3 g 根系在液氮中研磨,酚提取液(0.1 g PVPP、10 mL 酚提取液和 10 mL-Tris 饱和酚)抽提;冰上 30 min 后离心(5000 r/min, 30 min);取上层酚相,再用等体积的酚提取液抽提;加入 5 倍体积的醋酸铵甲醇溶液,冰上 30 min 后,-20℃下过夜;离心(5000 r/min, 30 min),沉淀用甲醇和丙酮先后洗涤,再用丙酮溶解,离心(12 000 r/min, 20 min),将获得的沉淀室温干燥,即可得到蛋白质团块,-80℃下保存备用。

1.2.3 一向等电聚焦和二向 SDS-PAGE

在干燥后的蛋白质团块中加入 200 μ L Alk lysis 缓冲液(20 mmol/L Tris, 2 mol/L 硫脲, 7 mol/L 尿素和 2% CHAPs)溶解(pH 8.5)。Cy3 染料和 Cy5 染料分别用于标记健株和病株根系的蛋白, Cy2 染料标记健株和病株根系等量混合后的蛋白作为内标。使用不同染料标记的蛋白在同一根 IPG 胶条和同一张胶里进行电泳, IPG 等电聚焦系统(GE 公司)进行双向凝胶电泳第 1 向,等电聚焦程序如下: S1, 0.5 h 升至 300 V; S2, 0.5 h 升至 700 V; S3, 1.5 h 升至 1500 V; S4, 3 h 运行到 9000 V; S5, 9000 V 下保持 4 h, 整个聚焦过程总电压为 52 kV·h。将平衡好的胶条转移到 12.5% SDS-PAGE 凝胶上,置于 ETTAN DALTsix 电泳系统(GE),二向电泳程序如下:先以 2 W/胶条运行 45 min;然后再以 17 W/胶条运行约 4.5 h,直至溴酚蓝跑到底。

1.2.4 扫描与图像分析

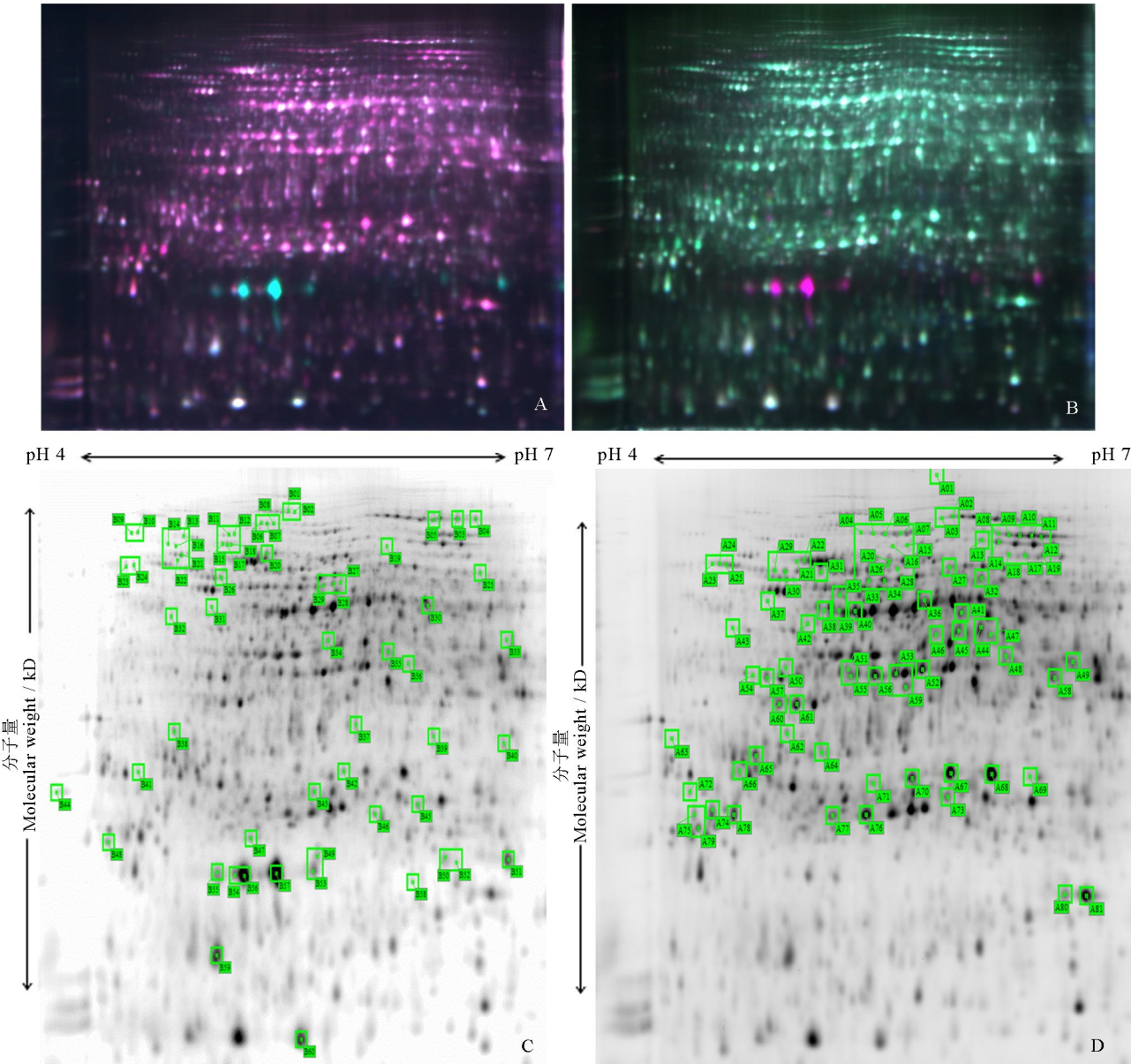
经荧光标记的蛋白用激光扫描仪 Typhoon 9400(GE 公司)扫描获得 2D-DIGE 的蛋白表达图像,采用图像分析软件系统 Image Master 2D platinum 7.0(GE)对图像进行分析,以确立差异表达大于 1.5 倍的蛋白质点。

1.2.5 MALDI-TOF-MS 鉴定及蛋白质查询

选取的蛋白质经酶解后,委托广州辉骏生物科技有限公司采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Autoflex speed™MALDI-TOF-TOF, Bruker Dalton, 德国)进行质谱分析。实验样品的质谱图均以默认模式获得。利用软件 BioTools(Bruker Dalton)在 NCBI 数据库中寻找相匹配的蛋白质并进行功能查询。

1.2.6 生物信息学分析

采用 GOMiner 软件对差异蛋白进行基因本体(Gene ontology, GO)聚类分析,在京都基因与基因



A—Cy3 标记水稻健株根部蛋白,Cy5 标记 RGSV 水稻病株根部蛋白; B—Cy3 标记 RGSV 水稻病株根部蛋白, Cy5 标记水稻健株根部蛋白; C—RGSV 病株根部差异蛋白表达升高; D—健株根部差异蛋白表达升高。

A, Cy3-labeled proteins of RGSV-uninfected rice roots. Cy5-labeled proteins of RGSV-infected rice roots. B, Cy3-labeled proteins of RGSV-infected rice roots; Cy5-labeled proteins of RGSV-uninfected rice roots. C, Up-regulated proteins in RGSV-infected rice roots. D, Up-regulated proteins in uninfected rice roots.

图 1 水稻病健植株根部蛋白双向凝胶电泳及差异表达蛋白位点
Fig. 1. 2-DE maps of proteins in rice roots infected with RGSV.

组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库中进行生物通路分析。

2 结果与分析

2.1 RGSV 侵染水稻根部差异表达蛋白质组分析
RGSV 水稻病株和健株根部蛋白的双向荧光差

异凝胶电泳叠加图见图 1-A 和 1-B。DIGE 分析显示 RGSV 侵染水稻后根部差异倍数大于 1.5 的差异蛋白质点有 141 个(图 1),其中,表达丰度升高的点有 60 个(图 1-C),表达丰度下降的点有 81 个(图 1-D);而差异倍数大于 2 的蛋白质点有 56 个,其中,表达丰度升高的点有 34 个,表达丰度下降的点有

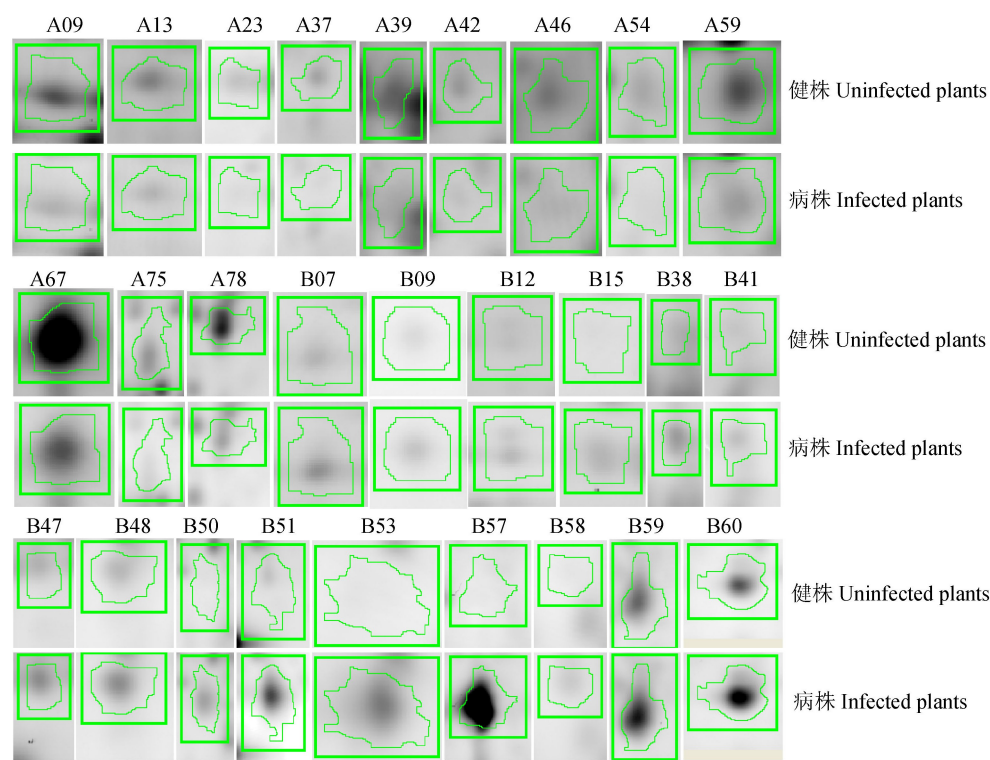


图 2 经质谱鉴定的差异表达蛋白点的放大图
Fig. 2. The ‘spot view’ of proteins identified by MS.

22 个。

2.2 差异表达蛋白 MALDI-TOF-MS 鉴定

在差异倍数大于 2 的蛋白质点中选取 42 个差异表达最明显的蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 分析,鉴定出 27 个蛋白质点,各蛋白的电泳斑点局部放大见图 2。在鉴定出的蛋白质中表达上调的有 15 个,下调的有 12 个。B50 和 B51 经鉴定同为 RGSV 的 P5 蛋白,B53 和 B57 经鉴定同为 RGSV 的 20.6 kD 非结构蛋白。通过与 NCBI 数据库比对和查询,获得各蛋白点的信息,包含蛋白质的名称、等电点、分子量、登录号、蛋白质得分和差异蛋白比值(表 1)。

2.3 差异蛋白的生物信息学分析

对已鉴定的差异蛋白进行 GO 功能注释。生物学过程分析表明差异蛋白涉及生物合成过程、碳水化合物代谢过程、细胞氨基酸代谢过程、运输、小分子代谢过程、分解代谢过程、对胁迫的响应、含碱基化合物的分解过程、细胞氮化合物代谢过程和前体代谢物质和能量的产生等多个生物学过程。在生物功能上分属 10 类,包括离子作用、激酶活性、ATP

酶活性、跨膜转运活性、氧化还原酶活性、裂解酶活性、RNA 结合、DNA 结合、结合核酸的转录因子活性和水解酶活性。细胞组件分析显示差异蛋白定位于细胞质、蛋白复合体、胞液、胞内、线粒体、质体、核、质膜和细胞壁等部位。

KEGG 通路分析显示,3 个蛋白参与了代谢途径,2 个蛋白参与了次级代谢产物的生物合成,其他 10 个蛋白分别参与了乙醛酸和二羧酸代谢、内质网上的蛋白质加工过程、丙酮酸代谢、柠檬酸循环、苯丙氨酸代谢、光合生物固碳反应、植物与病原物互作、氧化磷酸化、碳代谢和类苯丙烷合成等生物通路。

3 讨论

本研究利用 2D-DIGE 技术分析了 RGSV 侵染水稻根系的差异表达蛋白谱,并利用质谱技术鉴定了部分差异蛋白。本研究鉴定了 25 个差异蛋白,其中包括 2 个 RGSV 编码的病毒蛋白和 23 个寄主水稻的蛋白。水稻草矮病株根部 *OsPHR2* 和 *Crl-5* 基因表达下调^[7]。本研究未鉴定到这两个蛋白,这

表 1 经质谱鉴定的差异表达蛋白

Table 1. Differentially expressed proteins identified by MS.

编号 Spot No.	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession No.	蛋白质 得分 Protein score	蛋白质 分子量 Protein MW/Da	蛋白质 等电点 Protein PI	差异蛋白 比值 Ratio
A09	假定蛋白 OsI_11950 (籼稻) Hypothetical protein OsI_11950 (<i>indica</i>)	gi 125544232	186	93378	5.94	−2.56
A13	5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸高半胱氨酸甲基转移酶(长春花) 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransfer (<i>Catharanthus roseus</i>)		120	85089	6.10	−2.09
A23	Alpha-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 C 端家族蛋白(梗稻) Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminus family protein (<i>japonica</i>)	gi 108707861	143	74479	4.91	−3.34
A37	Os04g0670800(梗稻) Os04g0670800 (<i>japonica</i>)	gi 115461232	73	37818	5.29	−2.31
A39	假定蛋白 OsJ_19476 (梗稻) Hypothetical protein OsJ_19476 (<i>japonica</i>)	gi 222632492	294	55389	6.00	−2.05
A42	Os01g0615300(梗稻) Os01g0615300 (<i>japonica</i>)	gi 115438576	77	46133	5.13	−2.26
A46	S-腺苷甲硫氨酸合成酶 2 S-adenosylmethionine synthase 2	gi 3024122	185	43330	5.68	−2.49
A54	腺苷激酶(水稻) Adenosine kinase (<i>Oryza sativa</i>)	gi 21698922	164	32573	5.29	−3.04
A59	Os10g0478200(梗稻) Os10g0478200 (<i>japonica</i>)	gi 115482534	184	35888	5.75	−2.06
A67	Os05g0247100(梗稻) Os05g0247100 (<i>japonica</i>)	gi 297604125	270	32757	6.08	−3.22
A75	苯丙氨酸解氨酶(梗稻) Phenylalanine ammonia-lyase(<i>japonica</i>)	PAL1_ORYSJ	372	76021	6.07	−3.25
A78	Os04g0659300(梗稻) Os04g0659300 (<i>japonica</i>)	gi 115461070	148	27916	5.01	−3.20
B07	具有 CCCH 锌指结构域的蛋白质 32 (梗稻) Zinc finger CCCH domain-containing protein 32 (<i>japonica</i>)	C3H32_ORYSJ	25	80795	5.33	+2.41
B09	可能的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 4(梗稻) Probable RNA-dependent RNA polymerase 4 (<i>japonica</i>)	RDR4_ORYSJ	23	133512	6.65	+2.59
B12	tRNA wybutosine 合成同源蛋白 1(梗稻) tRNA wybutosine-synthesizing protein 1 homolog (<i>japonica</i>)	TYW1_ORYSJ	24	72062	5.90	+2.04
B15	热激蛋白 90(梗稻) Heat shock protein 90 (<i>japonica</i>)	gi 39104468	99	80449	4.98	+11.05
B38	Os01g0940800(梗稻) Os01g0940800 (<i>japonica</i>)	gi 115442155	98	34833	4.65	+2.81
B41	谷蛋白-2(玉米) Glutelin-2(<i>Zea mays</i>)	GLU2_MAIZE	26	24528	8.40	+2.29
B47	假定蛋白 OsI_34134(籼稻) Hypothetical protein OsI_34134 (<i>indica</i>)	gi 125532460	177	24741	5.50	+2.25
B48	病程相关类甜蛋白(水稻) Pathogenesis-related thaumatin-like protein (<i>Oryza sativa</i>)	gi 2062387	199	20024	4.52	+2.10
B50	P5 蛋白(水稻草矮病毒) P5 protein (<i>Rice grassy stunt virus</i>)	gi 483926501	204	21932	6.89	+10.59
B51	P5 蛋白(水稻草矮病毒) P5 protein (<i>Rice grassy stunt virus</i>)	gi 483926501	387	21932	6.89	+10.09
B53	20.6 kD 非结构蛋白(水稻草矮病毒) 20.6 kD nonstructural protein (<i>Rice grassy stunt virus</i>)	gi 9635244	264	20740	5.18	+20.61
B57	20.6 kD 非结构蛋白(水稻草矮病毒) 20.6 kD nonstructural protein (<i>Rice grassy stunt virus</i>)	gi 9635244	264	20740	5.18	+344.16
B58	假定蛋白 OsI_28286(籼稻) Hypothetical protein OsI_28286(<i>indica</i>)	gi 125560596	168	38650	5.85	+3.57
B59	Os12g0555000(梗稻) Os12g0555000 (<i>japonica</i>)	gi 115489014	78	17004	4.88	+2.13
B60	Os01g0348900(梗稻) Os01g0348900(<i>japonica</i>)	gi 115436436	216	15163	5.00	+2.70

+, 上调; −, 下调。
+, Up-regulated; −, Down-regulated.

2 个蛋白表达量变化还需进一步的实验分析。丁新伦等^[9]在水稻草矮病株叶部中鉴定了 24 个蛋白, 包含 2 个病毒蛋白和 22 个寄主蛋白, 在水稻草矮病毒根部和叶部鉴定到的病毒蛋白均为 P5 蛋白和 20.6 kD 非结构蛋白, 而鉴定到的根部蛋白和叶部蛋白均

不同。

在水稻病株根系中鉴定到 2 个 RGSV 编码蛋白: 22 kD P5 和 20.6 kD 非结构蛋白。RGSV 22kD P5 是 vRNA5 编码的非结构蛋白, 可在水稻病株叶片^[9-10]和介体褐飞虱中大量积累^[10], 可能在病毒侵

染植物和昆虫介体中起作用。20.6 kD 非结构蛋白由 vRNA6 编码,可在水稻病叶中大量积累^[9-10],其含量变化与症状的严重度密切相关,为病害特异性蛋白(Specific-disease protein, SP)^[11-12]。本研究表明,P5 蛋白和 20.6 kD 非结构蛋白均可在 RGSV 侵染的水稻根系中积累,20.6 kD 非结构蛋白积累量更多。P5 和 20.6 kD 非结构蛋白可能是 RGSV 侵染引致水稻根系发育异常的关键蛋白。

在鉴定出的水稻蛋白中,有 5 个蛋白参与胁迫反应,包括 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 2、热激蛋白 90、病程相关类甜蛋白、Os10g0478200、和 Os12g0555000。蛋白点 A46 鉴定为 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 2,催化合成 S-腺苷甲硫氨酸,是生物体内主要的甲基供体,并且另一蛋白点 A13 鉴定为 5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸高半胱氨酸甲基转移酶。这 2 种蛋白均参与了与甲基转移相关的反应,基因表达均下调。由此可以推测与甲基转移相关的反应,如 DNA 的甲基化等,在 RGSV 和水稻互作中起调控作用。蛋白点 B15 鉴定为热激蛋白 90(Heat shock protein 90, HSP90),HSP90 在植物生长发育、对非生物胁迫环境应答和抗病性反应中起着重要作用^[13]。烟草 HSP90 与 RAR1 和 TIR-NB-LRR 蛋白互作,提高了植株对烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的抗性^[14]。在小麦植株中过表达 TaHsp90.2 和 TaHsp90.3 基因,可显著提高其对条锈病的抗性^[15]。RGSV 侵染后诱导 HSP90 上调表达,KEGG 通路分析显示其参与植物与病原物互作途径。RGSV 侵染可诱导 HSP90 在水稻根中表达,HSP90 可能在水稻对 RGSV 的抗病反应中起重要作用。蛋白点 B48 鉴定为病程相关类甜蛋白(thaumatin-like protein, TLP),该蛋白属于病程相关蛋白的 PR5 家族,病原物可诱导其表达,与植物的抗逆性有关。TLPs 可参与多种植物病原真菌侵染之后的主动防御反应,如水稻纹枯病菌(*Rhizocotoni-asolani*)侵染水稻可诱导 TLPs 基因表达,提高了水稻对该病原菌的抗性^[16-17]。RGSV 侵染诱导 TLP 基因表达上调,TLP 可能参与了 RGSV 侵染后水稻的主动防御反应过程。

蛋白点 B09 鉴定为可能的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 4。植物 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependant RNA polymerase, RDR)主要参与了与植物基因沉默相关的小 RNA 产生,通过基因沉默效应放大作用,以调节植物的生长发育、逆境

应答以及对病毒的防御等生物学过程^[18]。烟草 NtRDR1 和拟南芥 AtRDR1 受病毒感染的诱导而表达,并且基因的缺失影响着植物对病毒的防御能力^[19-20]。RNA 依赖性 RNA 聚合酶 OsRDR6 在水稻抵御条纹叶枯病毒的过程中发挥重要作用^[21]。可能的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 4 受 RGSV 的诱导表达上调,可能参与了水稻对 RGSV 的抗性反应。

蛋白点 A75 鉴定为苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)。PAL 是植物苯丙氨酸类代谢过程中关键限速酶,其产物木质素、黄酮和酚类物质与抗病性相关^[22-23]。植物激素水杨酸(Salicylic Acid, SA)是植物抗病反应的信号分子,PAL 也是 SA 合成途径中的关键酶之一^[24-25]。Tonnessen 等^[26]的研究表明 OsPAL4 参与水稻的防卫反应,在病原物的抗性反应中表达上调,缺失了 OsPAL4 基因的水稻突变体对水稻白叶枯病、稻瘟病和稻纹枯病感病性增强。RGSV 可能通过干扰 PAL 的表达抑制植物的防御反应。

其他蛋白如假定蛋白 OsI_11950 和 Os04g0670800 等其功能未知。本研究在水稻草矮病株根系中鉴定出来的部分蛋白可能在水稻抗 RGSV 的抗性中起作用,其在根系发育异常以及 RGSV 与水稻互作中的作用还需进一步验证。

参考文献:

- [1] 周国辉,张曙光,邹寿发,等.水稻新病害南方水稻黑条矮缩病发生特点及危害趋势分析.植物保护,2010,36(2):144-146.
Zhou G H, Zhang S G, Zou S F, et al. Occurrence and damage analysis of a new rice dwarf disease caused by *Southern rice black-streaked dwarf virus*. *Plant Prot*, 2010, 36(2): 144-146. (in Chinese with English abstract)
- [2] 周雪平,濮祖芹,方中达.黄瓜花叶病毒(CMV)土壤非介体传播研究.南京农业大学学报,1994,17(2):39-42.
Zhou X P, Pu Z Q, Fang Z D. Non-vectored soil transmission of cucumber mosaic virus. *J Nanjing Agric Univ*, 1994, 17(2): 39-42. (in Chinese with English abstract)
- [3] Keeling B L. Effect of soybean mosaic virus on root volume and dry weight of soybean plants. *Crop Sci*, 1982, 22(3): 629-630.
- [4] 陈德鑫,王凤龙,李多川,等.山东烟草病毒病发生特点及防治对策.中国烟草科学,2007,28(1):25-28.
Chen D X, Wang F L, Li D C, et al. Epidemic characteristics of tobacco virus disease and control measures in Shandong Province. *Chin Tob Sic*. 2007, 28(1):25-28. (in Chinese with

English abstract)

- [5] 王煜炜, 冯俊丽, 林若虹, 等. 病毒侵染对番茄根茎组织中 miRNAs 调控通路的影响. 北京: 中国科技论文在线[2012-02-23]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201202-928>.
Wang Y W, Feng J L, Lin R H, et al. The interference of miRNAs pathway during tomato root and stem tissues development upon virus infections. Beijing: Sciencepaper Online [2012-02-23]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201202-928>.
- [6] 林奇英, 谢联辉, 谢荔岩, 等. 中菲两种水稻病毒病的比较研究: II. 水稻草状矮化病的病原学//谢联辉. 水稻病毒: 病理学与分子生物学. 福州: 福建科学技术出版社, 2001: 176-180.
Lin Q Y, Xie L H, Xie L Y, et al. Comparative study on two kinds of rice virus disease between China and Philippines; II. Pathogen of rice grassy stunt virus disease//Xie L H. Rice Virus: Pathology and Molecular Biology. Fuzhou: Fujian Science & Technology Publishing House, 2001: 176-180.
- [7] 丁新伦, 谢荔岩, 潘贤, 等. 水稻草状矮化病毒侵染下水稻根发育相关基因的表达分析. 中国农学通报, 2014, 30(36): 120-123.
Ding X L, Xie L Y, Pan X, et al. Transcriptional analysis of the root development related genes in host rice (*Oryza sativa*) infected with *Rice grassy stunt virus*. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(36): 120-123. (in Chinese with English abstract)
- [8] Carpentier S C, Witters E, Laukens K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 2005, 5: 2497-2507.
- [9] 丁新伦, 谢荔岩, 吴祖建. 水稻草状矮化病毒侵染寄主水稻差异表达蛋白的鉴定和分析. 中国农业科学, 2014, 47(9): 1725-1734.
Ding X L, Xie L Y, Wu Z J. Identification and analysis of differentially expressed proteins of host rice (*Oryza sativa*) infected with *Rice grassy stunt virus*. *Sci Agric Sin*, 2014, 47(9): 1725-1734. (in Chinese with English abstract)
- [10] Chomchan P, Miranda G J, Shirako Y. Detection of rice grassy stunt tenuivirus nonstructural proteins p2, p5 and p6 from infected rice plants and from viruliferous brown planthoppers. *Arch Virol*, 2002, 147(12): 2291-2300.
- [11] Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, et al. Ambisense segment 4 of rice stripe virus: Possible evolutionary relationship with phleboviruses and uukuviruses (Bunyaviridae). *J Gen Virol*, 1990, 71: 1427-1432.
- [12] Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA4 of rice stripe virus isolate T and comparison with another isolate and with maize stripe virus. *J Gen Virol*, 1992, 73: 1309-1312.
- [13] Sangster TA, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 86-92.
- [14] Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, et al. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2101-2108.
- [15] Wang G F, Wei X N, Fan R C, et al. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): Functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytol*, 2011, 191(2): 418-431.
- [16] Velazhahan R, Chencole K, Anuratha C S, et al. Induction of thaumatin-like protein(TLPs) in *Rhizoctonia solani*-infected rice and characterization of two new cDNA clones. *Physiol Plantarum*, 1998, 102: 21-28.
- [17] Fu D, Tisserat N A, Xiao Y, et al. Overexpression of rice TLPD34 enhances dollar-spot resistance in transgenic bentgrass. *Plant Sci*, 2005, 168(3): 671-680.
- [18] Qi X, Bao F S, Xie Z. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e4971.
- [19] Xie Z, Fan B, Chen C, et al. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *PNAS*, 2001, 98(11): 6516-6521.
- [20] Yu D, Fan B, MacFarlane S A, et al. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(3): 206-216.
- [21] Jiang L, Qian D, Zheng H, et al. RNA-dependent RNA polymerase 6 of rice (*Oryza sativa*) plays role in host defense against negative-strand RNA virus, *Rice stripe virus*. *Virus Res*, 2012, 163(2): 512-519.
- [22] LaCamera S, Gouzerh G, Dhondt S, et al. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: The contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 267-284.
- [23] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant*, 2010, 3(1): 2-20.
- [24] Gruner K, Griebel T, Návarová H, et al. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 1-28.
- [25] Malamy J, Carr J P, Klessig D F, et al. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 2014, 343(6178): 1002-1004.
- [26] Tonnessen B W, Manosalva P, Lang J M, et al. Rice phenylalanine ammonia-lyase gene OsPAL4 is associated with broad spectrum disease resistance. *Plant Mol Biol*, 2015, 87(3): 273-286.