

水稻黑条矮缩病毒 *P7-1* 基因对水稻的遗传转化及转基因植株的抗病性分析

袁平平^{1,2} 孙枫² 倪海平² 朱佳慧² 周益军² 蒋选利^{1,*} 徐秋芳^{2,*}

(¹贵州大学 农学院, 贵阳 550025; ²江苏省农业科学院 植物保护研究所, 南京 210014; *通讯联系人, E-mail: xuqiufang@jaas.ac.cn; JXL3237@163.com)

Genetic Transformation of *Rice black streaked dwarf virus P7-1* Gene in Rice and Its Virus Resistance Analysis

YUAN Pingping^{1,2}, SUN Feng², NI Haiping², ZHU Jiahui², ZHOU Yijun², JIANG Xuanli^{1,*}, XU Qiufang^{2,*}

(¹College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; *Corresponding author, E-mail: xuqiufang@jaas.ac.cn; JXL3237@163.com)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study is to determine whether *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) *P7-1* is an important pathogenic factor related to infertility in rice and to analyze the resistance of the *P7-1* transgenic rice to RBSDV by overexpression of *P7-1* in rice. 【Method】RBSDV *P7-1* gene was amplified from virus-infected plants by RT-PCR. The recombination plasmid pCAMBIA-1300-*P7-1* was constructed and transformed to rice by *Agrobacterium* transformation. The fertility of transgenic plants was evaluated and the resistance of the transgenic rice plants to RBSDV was identified by artificial inoculation of virus. 【Result】The transgenic plants showed normal growth and fertility. The virus accumulation in the transgenic plants was significantly lower than the wild type at 7 days and 14 days after inoculation, but it was higher in some transgenic lines than the control at 28 days after inoculation. There were no significant differences in disease incidence between the transgenic plants and the wild type at 30 days after inoculation. 【Conclusion】Overexpressing RBSDV *P7-1* in rice does not affect the fertility. Transgenic rice had lower accumulation of virus in the early stage after RBSDV infection, but did not exhibit resistance to the virus at the later stage.

Key words: *Rice black streaked dwarf virus*; overexpression; fertility; resistance evaluation

摘 要: 【目的】通过在水稻中过量表达水稻黑条矮缩病毒(*Rice black streaked dwarf virus*, RBSDV) *P7-1* 基因, 分析 RBSDV *P7-1* 是否是导致水稻不育的重要致病因子, 并明确过量表达 *P7-1* 转基因植株对病毒的抗性。【方法】采用 RT-PCR 方法从感病植物中扩增获得 RBSDV *P7-1* 基因, 构建 pCAMBIA-1300-*P7-1* 载体, 通过农杆菌转化法获得转基因水稻, 观察水稻是否能够正常结实, 并采用人工接种病毒方法分析转基因植株的抗性。【结果】过量表达 RBSDV *P7-1* 的转基因水稻生长、结实正常。在接种 7 d 和 14 d 时转基因植株中病毒积累量显著低于野生型对照, 但在 28 d 时部分转基因株系中病毒积累量高于对照, 接种 30 d 时转基因植株的发病率与对照无明显差异。【结论】在水稻中过量表达 RBSDV *P7-1* 不影响水稻的结实; 转基因水稻在 RBSDV 侵染早期可抑制病毒的积累, 但在后期对病毒的抗性与对照没有明显差异。

关键词: 水稻黑条矮缩病毒; 过量表达; 育性; 抗性评价

中图分类号: S435.111.4⁺9; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)04-0342-07

水稻黑条矮缩病毒(*Rice black streaked dwarf virus*, RBSDV)为呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(*Fijivirus*)成员, 主要通过介体灰飞虱以持久增殖方式传播, 可侵染水稻、小麦、玉米等禾本科植物^[1]。水稻感染该病毒后表现为植株矮缩, 叶色浓

绿, 不抽穗或穗小, 叶脉和茎秆上早期出现蜡白色、后期出现黑褐色的瘤状突起^[2]。20 世纪 60 年代和 90 年代后期, 水稻黑条矮缩病在我国暴发流行, 部分地区病害发生率超过了 90%^[3]。2007 年以来, 该病害又在江苏等地粳稻上普遍发生, 2008 年仅江苏

收稿日期: 2018-01-05; 修改稿收到日期: 2018-05-08。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0300706); 国家自然科学基金资助项目(31471768)。

省发病面积达 26.7 万 hm^2 , 2009 年增加到 33.3 万 hm^2 , 且由于目前生产上推广的品种绝大多数不抗水稻黑条矮缩病, 对水稻生产造成巨大威胁^[4]。

RBSDV 病毒基因组由 10 条线性双链 RNA 组成, 根据其在聚丙烯酰胺凝胶上的迁移速率由快到慢的顺序依次称为 S1~S10。S7 全长 2193 nt, 编码 363 个氨基酸, 含有两个不重叠的 ORF, 编码两个蛋白 P7-1 和 P7-2, 均为病毒的非结构蛋白^[5]。在感病植物和介体昆虫中均可检测到 P7-1 蛋白的表达, 但在不同寄主中的大小存在差异。在感病植物中 P7-1 蛋白的大小为 41 kD, 而在昆虫中则为 44 kD, 暗示 P7-1 在不同的寄主中可能存在不同的修饰^[6]。免疫胶体金标记显示 P7-1 在管状结构中大量存在, 表明其为管状结构的主要组成部分, 在 RBSDV 感染的细胞中, 管状结构常常不完全封闭, 其中含有大量病毒颗粒^[6]。P7-1 的亚细胞定位分析表明, 该蛋白在质壁分离的细胞中可定位于细胞核、细胞质、细胞周围, 并与胞间连丝的标记蛋白 PDLPI 存在共定位^[7]。

植物感染 RBSDV 后表现矮化, 不能正常抽穗结实。在非寄主植物拟南芥中过量表达 RBSDV *P7-1* 基因后花药不能开裂, 花药中的木质素含量显著下降, 转基因植株不能正常结实^[8]。由于拟南芥不是 RBSDV 的寄主植物, 为进一步研究 RBSDV *P7-1* 基因功能, 明确其是否是导致寄主植物不育的致病因子, 我们构建了 pCAMBIA1300-P7-1 的重组表达载体, 转化水稻日本晴, 获得了过量表达 RBSDV *P7-1* 的转基因植株, 并分析了转基因植株对病毒的抗性。

1 材料与方法

1.1 材料

用于扩增水稻黑条矮缩病毒(RBSDV) *P7-1* 基因的感病水稻采自江苏省泰州市姜堰区, 用于接种的灰飞虱由江苏省农业科学院植物保护研究所病害室饲养保存。用于遗传转化的水稻品种为日本晴。

1.2 RBSDV *P7-1* 基因的克隆

根据 NCBI 数据库中 RBSDV *S7-1* 基因(登录号: AF397894)序列设计扩增 *P7-1* 基因的 PCR 引物 *P7-1-Asc* I-F 和 *P7-1-Pac* I-R(表 1), 扩增产物的理论大小为 1089 bp。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

采用 Trizol 试剂(TaKaRa)提取感染 RBSDV 的水稻叶片总 RNA, 利用反转录试剂盒(PrimeScript™

RT Reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa)合成 cDNA。PCR 体系如下: cDNA 1.0 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 10×*Taq* 缓冲液 2.5 μL , dNTP 0.5 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , 加 ddH₂O 补足至 25.0 μL 。PCR 条件如下: 94℃下 5 min; 94℃下 1 min, 56℃下 40 s, 72℃下 1 min, 32 个循环; 72℃下延伸 10 min。

P7-1 的 PCR 扩增产物经 DNA 回收后连接至 pMD18-T 载体, 采用菌落 PCR 筛选阳性克隆后, 提取质粒, 酶切鉴定插入片段大小。酶切正确的质粒进行测序, 基于 NCBI 数据库进行核酸序列比对, 采用 DNASTAR 软件分析氨基酸序列的同源性, 获取 pMD18T-P7-1 重组质粒。

1.3 重组表达载体 pCAMBIA-1300-P7-1 的构建

用限制性内切酶 *Asc* I 和 *Pac* I 酶切 pMD18T-*P7-1* 重组质粒, 酶切所得 *P7-1* 基因片段回收后用 T4 连接酶定向连接至 pCAMBIA-1300 表达载体。采用扩增 *P7-1* 基因引物进行 PCR, 筛选阳性克隆, 采用 *Asc* I 和 *Pac* I 酶切阳性克隆质粒, 获得 pCAMBIA-1300-P7-1 重组表达载体。

1.4 农杆菌介导的遗传转化及转基因水稻的检测

1.4.1 农杆菌介导的遗传转化

挑选成熟、饱满的水稻种子, 去颖壳后进行水稻愈伤组织的诱导和继代培养, 将 pCAMBIA-1300-P7-1 质粒采用电击法导入 GV3101 农杆菌, 挑选愈伤组织后进行农杆菌转化, 在筛选培养基上筛选后, 进行分化、生根培养, 获得 T₀ 转基因植株。

1.4.2 转基因水稻鉴定

采用 CTAB 法提取 T₀ 代转基因植株叶片总 DNA。用扩增潮霉素磷酸转移酶(*HPT*)基因的引物 *HPT-F* 和 *HPT-R* 进行 PCR 检测。采用 Trizol 法提取转基因植株叶片总 RNA 后, 反转录获得 cDNA,

表 1 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study.

| 引物名称 Primer name | 序列 Sequence(5'-3') |
|---------------------|--------------------------------|
| <i>P7-1-Asc</i> I-F | GGCGCGCCATGGATAGACCTGCTCGAGAAC |
| <i>P7-1-Pac</i> I-R | TTAATTAAGCAGAAGGAGATGAAAAAG |
| <i>HPT-F</i> | TTCCTTTGCCCTCGGACG |
| <i>HPT-R</i> | ACTCACGCGACGTCTGT |
| <i>P7-1-F1</i> | ACCTCCTCCACCCCGAAA |
| <i>P7-1-R1</i> | GTGGAAGTGGAGATCGCCATA |
| <i>OsActin-F</i> | CAGCCACACTGTCCCATCTA |
| <i>OsActin-R</i> | AGCAAGGTCGAGACGAAGGA |
| RBSDV <i>P10-F</i> | GCCCCACGTTGCATCTTC |
| RBSDV <i>P10-R</i> | TGTTGGGCAAAGTGCTAGTTTC |

用 *HPT-F/HPT-R*(表 1)和 *P7-1-Asc I-F/P7-1-Pac I-R* 引物分别检测 *HPT* 和 *P7-1* 基因的表达。

T_0 阳性转基因植株收种后,采用 CTAB 法提取 T_1 转基因植株叶片 DNA,采用 *HPT* 引物进行 PCR 检测,收取分离比接近 3:1 的 T_1 转基因植株的种子,检测对应 T_2 株系分离情况, T_2 株系不发生分离的认为是纯合转基因株系。

1.5 RBSDV *P7-1* 基因表达分析

提取培养 20 d 的 T_2 代转基因植株叶片总 RNA,反转录获得 cDNA,采用扩增 *P7-1* 的引物(*P7-1-Asc I-F/P7-1-Pac I-R*)进行 PCR 扩增,分析转基因植株中 *P7-1* 基因是否表达。此外,采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 *P7-1* 基因的相对表达量。*P7-1* 基因的扩增引物为 *P7-1-F1* 和 *P7-1-R1*, *OsActin* 的扩增引物为 *OsActin-F* 和 *OsActin-R*(表 1)。qRT-PCR 参照 Xu 等^[10]的方法进行。

1.6 转基因植株对 RBSDV 的抗性分析

挑选 4 个 T_2 代纯合转基因株系(#-14, #-19, #-40, #-46),采用人工接种方法接种 RBSDV,以野生型日本晴作为对照。人工接种 RBSDV 参照周彤等^[9]的方法进行,略有修改。将 1~2 龄无毒灰飞虱若虫在感染 RBSDV 的水稻病株上饲喂 7 d 后,转接至武育梗 3 号水稻幼苗上,饲养 7 d 使其度过循环期,采用 ELISA 方法检测灰飞虱的带毒率,将携带 RBSDV 的灰飞虱按 2 或 3 头/株的虫量接种于 3 叶期野生型日本晴和 T_2 代 *P7-1* 转基因水稻上,每株苗接种 3 头有效虫;同时接种不携带 RBSDV 的无毒灰飞虱作为对照。接种 2~3 d 后将水稻苗移栽至大田,接种 30 d 后统计发病率。

人工接种 RBSDV 7 d、14 d、21 d、28 d 时,

将每个品系的水稻叶片进行混合取样,提取总 RNA,反转录合成 cDNA。采用 qRT-PCR 分析转基因植株和对照植株中编码病毒外壳蛋白的 *P10* 基因表达情况,以水稻 *actin* 为内参基因。RBSDV *P10* 引物为 RBSDV *P10-F* 和 RBSDV *P10-R*。qRT-PCR 参照 Xu 等^[10]的方法进行。

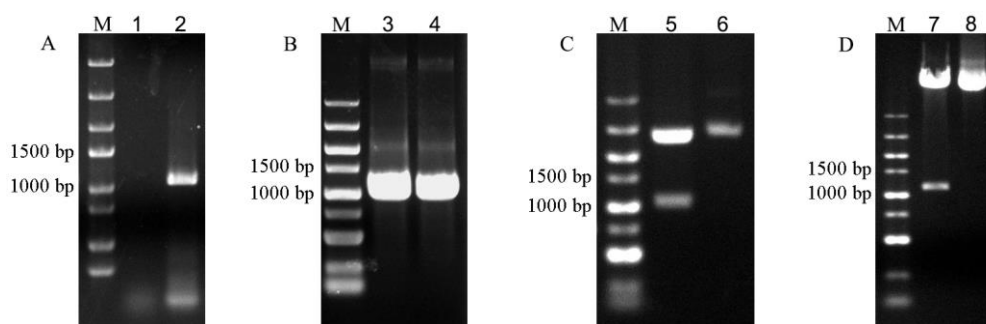
2 结果与分析

2.1 水稻黑条矮缩病毒 *P7-1* 基因克隆及序列分析

以感染 RBSDV 的水稻 cDNA 为模板,采用 *P7-1-Asc I-F/P7-1-Pac I-R* 为引物,PCR 扩增 *P7-1* 基因。琼脂糖凝胶电泳分析表明,PCR 扩增获得一条约 1.1kb 的条带,与目的基因理论大小 1089 bp 相符(图 1-A)。PCR 产物回收后连接 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌后采用 PCR 筛选获得阳性克隆(图 1-B)。阳性克隆质粒用 *Asc I* 和 *Pac I* 进行双酶切,可获得一条与目的基因大小一致的条带(图 1-C),表明 *P7-1* 基因已连入 pMD18-T 载体。pMD18T-*P7-1* 测序结果表明,克隆所得 *P7-1* 基因 ORF 长为 1089 bp,编码 363 个氨基酸。在 NCBI 网站进行比对分析,发现测序所得序列与 RBSDV *P7-1* CDS 核酸序列(登录号: AF397894)有 2 个碱基的差异,同源率为 99.8%,蛋白序列比对发现有 1 个位点的差异,同源率为 99.7%,表明扩增所得基因为 RBSDV *P7-1* 基因。

2.2 重组表达载体 pCAMBIA-1300-*P7-1* 的构建

采用限制性内切酶 *Asc I* 和 *Pac I* 酶切 pMD18T-*P7-1* 质粒,获得 *P7-1* 基因片段,回收后定向连接至经相同酶酶切的 pCAMBIA-1300 植物



A—PCR 扩增 RBSDV *P7-1* 基因(M—DNA 标记,泳道 1 和 2 分别为以健康和感病植株 cDNA 扩增 *P7-1* 的 PCR 产物); B—PCR 筛选 pMD18T-*P7-1* 阳性克隆; C 和 D—pMD18-T-*P7-1* 和 pCAMBIA-1300-*P7-1* 质粒的酶切分析(泳道 5 和 7 为重组质粒酶切产物,泳道 6 和 8 为未酶切的质粒对照)。

A, PCR amplification of RBSDV *P7-1* gene. M, DNA marker; Lane 1, cDNA of healthy rice; Lane 2, cDNA of virus-infected rice. B, Screening of positive clones of pMD18T-*P7-1* by PCR; C and D, Digestion identification of recombinant plasmid pMD18T-*P7-1* and pCAMBIA-1300-*P7-1* (Lanes 5 and 7, Digestion product; Lanes 6 and 8, Plasmid without enzyme digestion).

图 1 pCAMBIA-1300-*P7-1* 重组表达载体构建

Fig. 1. Construction of the pCAMBIA-1300-*P7-1* expression vector.

双元表达载体, 获得重组表达载体 pCAMBIA-1300-*P7-I*。重组载体用 *Asc* I/*Pac* I 进行酶切鉴定, 结果显示 pCAMBIA-1300-*P7-I* 双酶切后可获得与 *P7-I* 理论大小一致的条带(图 1-D), 表明成功构建获得重组表达载体 pCAMBIA-1300-*P7-I*。

2.3 农杆菌介导的遗传转化和分子检测

采用农杆菌介导法将 pCAMBIA-1300-*P7-I* 转化至水稻日本晴。经愈伤诱导、共培养、筛选、分化和生根等步骤, 在含有潮霉素的培养基上筛选获得 52 株具有抗性的 T_0 代转基因植株。为明确所得 T_0 转基因植株是否为阳性转基因植株, 提取 T_0 转基因植株叶片 DNA 后, PCR 扩增 *HPT* 基因, 结果显示 PCR 可扩增获得大小约 1 kb 的条带(图 2), 与目的片段大小(1009 bp)一致, 表明所检测 T_0 植株为转基因阳性植株。

提取 T_0 转基因植株叶片总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 分析 *HPT* 和 RBSDV *P7-I* 基因的表达情况。结果显示, T_0 转基因植株中可扩增获得与 *P7-I* 和 *HPT* 基因大小相符的条带(图 3), 表明 RBSDV

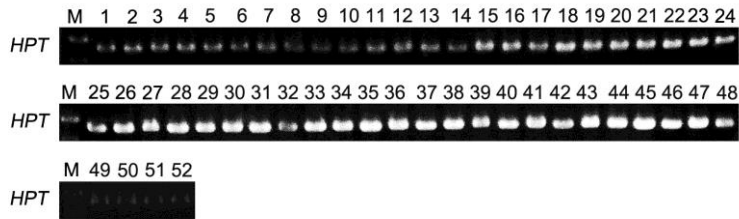
P7-I 基因在转基因植株中表达。

2.4 转基因水稻中 RBSDV *P7-I* 基因的表达分析

为明确 T_2 转基因植株中 *P7-I* 基因的表达情况, 采用 RT-PCR 和 qRT-PCR 分析了 4 个 T_2 纯合转基因株系(#-14, #-19, #-40, #-46)中 *P7-I* 的表达情况。PCR 结果表明, *P7-I* 在 4 个株系中均有表达(图 4)。qRT-PCR 结果分析显示, 在 4 个转基因株系中 RBSDV *P7-I* 的相对表达量分别为 *OsActin* 基因的 0.32、26.3、38.17 和 17.55 倍(图 5)。

2.5 转基因水稻对 RBSDV 的抗性分析

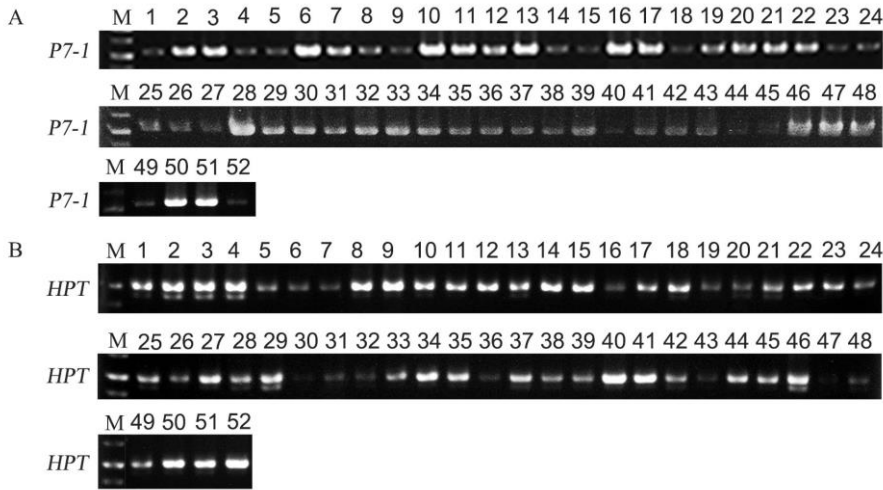
RBSDV *P7-I* 转基因植株的生长状态和结实情况与对照相似, 均可正常结实(图 6), 表明 *P7-I* 基因过量表达不影响水稻的结实。为分析过量表达 *P7-I* 转基因水稻对 RBSDV 是否具有抗性, 转基因植株接种 RBSDV 后, 采用 qRT-PCR 分析了过量表达 *P7-I* 对病毒积累量的影响。在接种病毒 7 d 和 14 d 时, 转基因植株中病毒的积累量显著低于野生型对照, 接种 7 d 时, #-14、#-19、#-40 和 #-46 中 *P10* 基因的表达量分别为对照的 11.5%、5.7%、6.2%



M—DNA 标记; 1~52: 转基因植株。
M, DNA marker, Lanes 1 to 52, Transgenic rice lines.

图 2 T_0 转基因植株的 PCR 检测

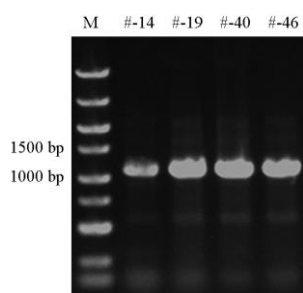
Fig. 2. PCR identification of T_0 transgenic plants.



A—RBSDV *P7-I* 基因扩增; B—*HPT* 基因扩增。M—DNA 标记; 1~52: 转基因植株。
A, RBSDV *P7-I* amplification, B, *HPT* amplification. M, DNA marker, Lanes 1 to 52, Transgenic rice lines.

图 3 T_0 转基因植株 *P7-I* 和 *HPT* 基因的 RT-PCR 分析

Fig. 3. Expression analysis of *P7-I* and *HPT* gene in T_0 transgenic plants by RT-PCR.

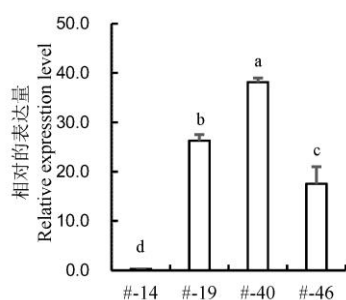


M, DNA 标记; #14, #19, #40 和 #46, T₂ 转基因株系。下同。

M, DNA marker; #14, #19, #40 and #46, T₂ transgenic plants. The same as below.

图4 RT-PCR 检测 T₂ 转基因植株中 *P7-I* 的表达

Fig. 4. Detection of *P7-I* genes in T₂ plants by RT-PCR.



柱上标不同小写字母代表差异达 0.05 显著水平。

Different letters mean significant difference at 0.05 level.

图5 qRT-PCR 检测 T₂ 转基因植株中 *P7-I* 的表达

Fig. 5. Expression of *P7-I* gene in T₂ transgenic plants by qRT-PCR.

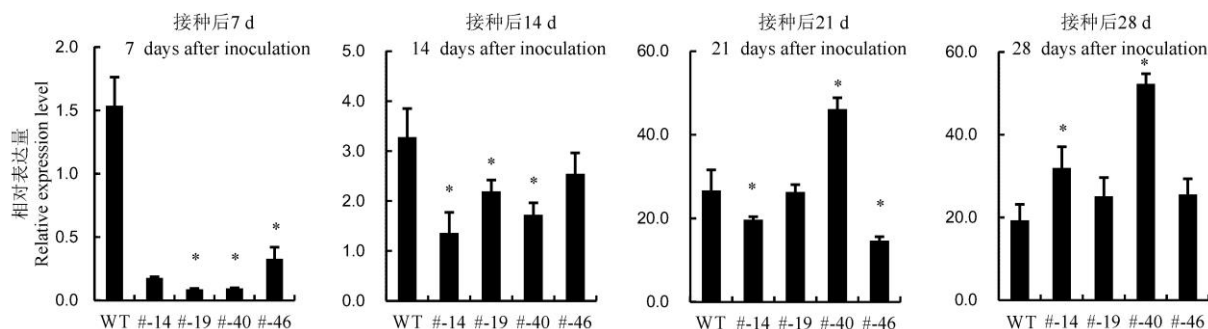


WT, 野生型; #14, #19, #40 和 #46, T₂ 转基因株系。下同。

WT, Wild type; #14, #19, #40 and #46, T₂ transgenic plants. The same below.

图6 过量表达 RBSDV *P7-I* T₂ 转基因植株的结实情况

Fig. 6. Seed setting of the T₂ transgenic plants with overexpression of RBSDV *P7-I*.



*代表与野生型相比差异达 0.05 显著水平。

*Compared with WT, difference was significant at 0.05 level.

图7 转基因植株人工接种病毒不同时间后 RBSDV *P7-I* 表达量分析

Fig. 7. Relative expression of RBSDV *P7-I* in transgenic plants as infected by virus for various time.

和 21.3%。在接种 21 d 时, 4 个转基因株系中有 2 个株系的病毒积累量低于对照, 但至接种 28 d 时, #19 和 #46 转基因植株中病毒的积累量与对照无显著性差异, #14 和 #40 植株中病毒积累量甚至显著高于对照(图 7)。以上结果表明, 转基因植株仅在病毒侵染早期对病毒具有一定的抗性。

RBSDV 接种转基因植株 30 d 后, 统计发病率。每株接种 3 头带毒虫, 4 个转基因株系及对照的发病率分别为 81.1%、86.7%、84.6%、80.0% 和 87.5%。每株接种 2 头带毒虫, 4 个转基因株系及对照的发病率分别为 70.6%、75.0%、92.0%、72.2% 和 80.0%, 表明过量表达 *P7-I* 基因后转基因植株对 RBSDV 不具有抗性。

3 讨论

由 RBSDV 侵染引起的水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病自 20 世纪 60 年代发生流行至今, 已有 50 多年的历史。近年来, 随着分子生物学等技术的发展, 在 RBSDV 病毒基因功能、病毒与植物互作及病毒致病机制等方面均取得了较大进展^[10-13]。RBSDV 侵染寄主植物后的转录组和 miRNA 测序、蛋白质组分析等结果表明细胞壁合成相关基因、激素途径等可能调控了植株矮缩、不育等性状^[14-15],

但病毒侵染导致植物矮缩并影响结实的机制还有待深入研究。已有研究表明 RBSDV P7-1 蛋白在拟南芥中过量表达后,花药不能开裂进而导致转基因植株不能结实,P7-1 很有可能是病毒侵染后导致植株不育的重要因子^[8]。为分析 P7-1 蛋白在病毒致病过程中的作用,我们在水稻中过量表达了 P7-1 基因,然而,转基因水稻并未表现不能结实的症状,其后代植株也能正常结实(图 6)。因此,P7-1 是否是病毒侵染后导致植物不育的致病因子还需进一步研究。

通过表达病毒基因获得抗病转基因植物是抗病毒基因工程的主要策略之一。自 1986 年在烟草中过量表达烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因获得能稳定遗传的抗病毒转基因烟草以来^[16],利用病毒蛋白基因如外壳蛋白、病毒复制酶基因和运动蛋白等介导植物对病毒产生抗性有许多成功例子^[17-18]。为明确本研究获得的过量表达 RBSDV P7-1 转基因植株是否具有对病毒的抗性,我们采用人工接种 RBSDV 的方法分析了转基因植株对病毒的抗性。结果显示,接种病毒 7 d 和 14 d 时,转基因植株中病毒积累量显著低于对照,但至接种 28 d 时转基因植株中的病毒积累量没有下降,且接种 30 d 时转基因植株发病率与对照没有显著差异,表明过量表达 P7-1 的转基因植株不具有对 RBSDV 抗性。有报道,在水稻中过量表达水稻矮缩病毒(RDV)的非结构蛋白 Pns11 的转基因植株不表现对 RDV 的抗性^[19]。这表明在植物中表达病毒的非结构蛋白基因不一定能产生对病毒的抗性。

病毒运动蛋白基因可介导植物对病毒抗性。将番茄斑驳病毒(TMoV)或烟草花叶病毒(TMV)缺失突变后的运动蛋白导入烟草后,转基因烟草可以抑制 TMoV 或 TMV 病毒侵染^[20-22]。将菜豆矮化花叶病毒(BDMV)野生型或突变的运动蛋白 BV1 或 BC1 基因导入到番茄后转基因番茄能推迟 ToMV 的感染^[23]。RBSDV P7-1 可在细胞内形成管状结构^[7,24],在植物中 P7-1 可定位于胞间连丝处^[7]。P7-1 转基因植株在接种病毒 7 d 和 14 d 时,病毒积累量显著低于对照,推测 P7-1 过量表达后在胞间连丝处通过影响病毒细胞间运动减缓病毒侵染。

参考文献:

- [1] Zhang H, Chen J, Lei J, Adams M J. Sequence analysis shows that a dwarfing disease on rice, wheat and maize in China is caused by rice black-streaked dwarf virus. *Eur J Plant Pathol*, 2001, 107(5): 563-567.
- [2] 欧阳元龙, 吴建祥, 熊如意, 周益军, 周雪平. 水稻黑条矮缩病毒外壳蛋白基因 S10 的原核表达、多克隆抗体制备及应用. *中国水稻科学*, 2010, 24(1): 25-30.
- [3] Ouyang Y L, Wu J X, Xiong R Y, Zhou Y J, Zhou X P. Prokaryotic expression of coat protein gene S10 of rice black-streaked dwarf virus, and preparation and application of its polyclonal antibody. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(1): 25-30. (in Chinese with English abstract)
- [4] 陈声祥, 张巧艳. 我国水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病研究进展. *植物保护学报*, 2005, 32(1): 97-103.
- [5] Chen S, Zhang Q. Advance in researches on rice black-streaked dwarf disease and maize rough dwarf disease in China. *Acta Phytophy Sin*, 2005, 32: 97-103. (in Chinese with English abstract)
- [6] 孙枫, 徐秋芳, 程兆榜, 范永坚, 周益军. 中国水稻黑条矮缩病研究进展. *江苏农业学报*, 2013, 29(1): 195-201.
- [7] Sun F, Xu Q F, Cheng Z B, Fan Y J, Zhou Y J. Advances in rice black-streaked dwarf disease in China. *Jiangsu J Agric Sci*, 2013, 29(1): 195-201. (in Chinese with English abstract)
- [8] 吕明芳, 羊健, 张恒木, 陈剑平. 水稻黑条矮缩病毒基因组 S7 编码的 2 个非结构蛋白在病株中的表达检测. *中国水稻科学*, 2012, 26(1): 9-15.
- [9] Lv M F, Yang J, Zhang H M, Chen J P. Detection of two nonstructural proteins encoded by genome segment S7 of rice black-streaked dwarf virus in infected rice plants. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(1): 9-15. (in Chinese with English abstract)
- [10] Isogai M, Uyeda I, Lee B C. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fivirus S7, S8, S9 and S10. *J Gen Virol*, 1998, 79(6): 1487-1494.
- [11] Sun Z, Zhang S, Xie L, Zhu Q, Tan Z, Bian J, Sun L, Chen J. The secretory pathway and the actomyosin motility system are required for plasmodesmatal localization of the P7-1 of rice black-streaked dwarf virus. *Arch Virol*, 2013, 158(5): 1055.
- [12] Sun F, Yuan X, Xu Q F, Zhou T, Fan Y J, Zhou Y J. Overexpression of rice black-streaked dwarf virus p7-1 in *Arabidopsis* results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e79514.
- [13] 周彤, 王英, 吴丽娟, 范永坚, 周益军. 水稻品种抗黑条矮缩病人工接种鉴定方法. *植物保护学报*, 2011, 38(4): 301-305.
- [14] Zhou T, Wang Y, Wu L J, Fan Y J, Zhou Y J. Method of artificial inoculation identification of rice cultivar resistance to rice black-streaked dwarf. *Acta Phytophy Sin*, 2011, 38(4): 301-305. (in Chinese with English abstract)
- [15] Xu Q F, Ni H P, Chen Q Q, Sun F, Zhou T, Lan Y, Zhou Y J. Comparative proteomic analysis reveals the cross-talk between the responses induced by H₂O₂ and by long-term rice black-streaked dwarf virus infection in rice. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e81640.
- [16] Tao T, Zhou C J, Wang Q, Chen X R, Sun Q, Zhao T Y, Ye J C, Wang Y, Zhang Z Y, Zhang Y L, Guo Z J, Wang

- X B, Li D W, Yu J L, Han C G. *Rice black streaked dwarf virus* P7-2 forms a SCF complex through binding to *Oryza sativa* SKP1-like proteins, and interacts with GID2 involved in the gibberellin pathway. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0177518.
- [12] He Y, Zhang H, Sun Z, Li J, Hong G, Zhu Q, Zhou X, MacFarlane S, Yan F, Chen J. Jasmonic acid-mediated defense suppresses brassinosteroid-mediated susceptibility to *Rice black streaked dwarf virus* infection in rice. *New Phytol*, 2017, 214(1): 388-399.
- [13] Liu X Y, Yang J, Xie L, Li J, Song X J, Chen J P, Zhang H M. P5-2 of *Rice black-streaked dwarf virus* is a non-structural protein targeted to chloroplasts. *Arch Virol*, 2015, 160(5): 1211-1217.
- [14] Jia M A, Li Y, Lei L, Di D, Miao H, Fan Z. Alteration of gene expression profile in maize infected with a double-stranded RNA fijiivirus associated with symptom development. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13(3): 251-262.
- [15] Zhou Y, Xu Z, Duan C, Chen Y, Meng Q, Wu J, Hao Z, Wang Z, Li M, Yong H, Zhang D, Zhang S, Weng J, Li X. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to *Rice black-streaked dwarf virus* in maize. *J Exp Bot*, 2016, 67(15): 4593-4609.
- [16] Abel P P, Nelson R S, De B, Hoffmann N, Rogers S G, Fraley R T, Beachy R N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, 232(4751): 738-743.
- [17] 赵辉, 贺萍萍, 郭静远, 孔华, 郭安平. 应用现代生物技术防治番木瓜 RNA 病毒研究进展. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4590-4599.
- Zhao H, He P P, Guo J Y, Kong H, Guo A P. The advances and prospects of using modern biotechnology to control papaya RNA virus. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(11): 4590-4599. (in Chinese with English abstract)
- [18] Li Y, Peng Y, Hallerman E M, Wu K. Biosafety management and commercial use of genetically modified crops in China. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(4): 565-573.
- [19] Zhao S, Hong W, Wu J, Wang Y, Ji S, Zhu S, Wei C, Zhang J, Li Y. A viral protein promotes host SAMS1 activity and ethylene production for the benefit of virus infection. *eLife*, 2017, 6: e27529.
- [20] Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas W J, Beachy R N. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J*, 2010, 4(6): 959-970.
- [21] Duan Y P, Powell C A, Webb S E, Purcifull D E, Hiebert E. Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, 10(5): 617-623.
- [22] Cooper B, Lapidot M, Heick J A, Dodds J A, Beachy R N. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology*, 1995, 206(1): 307-313.
- [23] Hou Y M, Sanders R, Ursin V M, Gilbertson R L. Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: Abnormal phenotypes and delayed infection by *Tomato mottle virus* in transgenic tomatoes expressing the *Bean dwarf mosaic virus* BV1 or BC1 proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13(3): 297-308.
- [24] Jia D S, Han Y, Sun X, Wang Z Z, Du Z G, Chen Q, Wei T Y. The speed of tubule formation of two Fijiviruses corresponds with their dissemination efficiency in their insect vectors. *Virol J*, 2016, 13(1): e174.
- [25] Kaplan I B, Shintaku M H, Li Q, Zhang L, Marsh L E, Palukaitis P. Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology*, 1995, 209(1): 188-199.