

水稻条纹病毒安徽分离物 NS3 基因的克隆 及其 RNA 沉默抑制子功能的初步鉴定

邓竹根¹, 丁菲², 贾琳², 宋培培³, 江彤^{1*}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 德州经济开发区东艺园林有限公司, 德州 253000;
3. 山东省平度市农业局, 平度 266700)

摘要: 采集安徽马鞍山水稻条纹叶枯病感病稻株, TRIZol 法提取样本总 RNA, 设计特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 获得水稻条纹病毒 (RSV) 安徽分离物的 RNA3 部分片段, 克隆并测序。序列分析表明, 该片段全长 874 nts, 含有完整的 NS3 基因, NS3 基因序列长度为 636 nts, 编码 211 个氨基酸。序列比对发现, RSV 安徽分离物 NS3 基因与来源于华东各省市 RSV 分离物 NS3 基因间的序列相似性高达 97.6%~99.4%, 而与 RSV 云南分离物 NS3 基因间的序列相似性相对较低, 为 93.4%~95.4%。构建 RSV NS3 基因系统关系树, 发现 RSV 安徽分离物 NS3 基因与来源于华东各省市 8 个 RSV 分离物 NS3 基因聚成一个单独的分支, 说明华东各省市各个 RSV 分离物亲缘关系最近。将 RSV 安徽分离物 NS3 基因插入植物表达载体 pBIN438, 构建重组植物表达载体 pBIN-NS3 并转化农杆菌。将含 pBIN-NS3 的农杆菌和含 pBIN-GFP 的农杆菌共浸润 16c 本氏烟叶片, 6 天后紫外灯下观察发现, 共浸润区表现出强烈的绿色荧光, 说明 16c 本氏烟 GFP 基因局部沉默被抑制, 可以初步证明 RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白是一个 RNA 沉默抑制子。

关键词: 水稻条纹病毒; NS3 基因; 克隆; 序列分析; RNA 沉默抑制子

中图分类号: S435.111.42

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0636-06

Cloning and preliminary identification of RNA silencing suppressor of gene NS3 of *Rice stripe virus* Anhui isolate

DENG Zhu-gen¹, DING Fei², JIA Lin², SONG Pei-pei³, JIANG Tong¹

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Dongyi Landscape Co. Ltd. of Dezhou Economic Development Zone, Dezhou 253000;

3. Pingdu Agricultural Bureau of Shandong, Pingdu 266700)

Abstract: Rice plants showing stripe disease were collected from Ma-Anshan, Anhui province. The total RNA was extracted from samples of rice plants by TRIzol method. A pair of specific primers was designed to amplify RNA3 partial fragment of *Rice stripe virus* Anhui isolate by RT-PCR, and then the fragment was cloned and sequenced. Sequence analysis results showed that the fragment was consisted of 874 nts, including 636 nts of full-length gene NS3 encoding 211 amino acids. Sequence comparison showed that gene NS3 of RSV Anhui isolate shared the high sequence similarity (97.6%-99.4%) with that of RSV isolates from East China, while had relatively lower nucleotide sequence similarity (93.4%-95.4%) to that of Yunnan isolates. A phylogenetic tree based on alignment of nucleotide sequences of genes NS3 of RSV was constructed. It was found that gene NS3 of RSV Anhui isolate and those of eight RSV isolates from East China clustered into a separate branch. The results indicated that RSV isolates from East China had the closest relationship. Gene NS3 of RSV Anhui isolate was inserted into plant expression vector pBIN438, and the recombinant plant expression vector pBIN-NS3 was constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens*. The leaves of *Nicotiana benthamiana* line 16c plants were

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (KJ2012A113, KJ2011A120) 和安徽省自然科学基金 (11040606M68) 共同资助。

作者简介: 邓竹根, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 江彤, 男, 副教授。E-mail: jiangtong4650@sina.com

co-infiltrated with *A. tumefaciens* mixtures carrying pBIN-NS3 and pBIN-GFP. Intense green fluorescence could be observed in the co-infiltrated patches under the UV light 6 days later. It was illustrated that the local silencing of gene *GFP* was inhibited, and it could be preliminarily demonstrated that protein NS3 encoded by RSV Anhui isolate was a RNA silencing suppressor.

Key words: *Rice stripe virus*; gene NS3; clone; sequence analysis; RNA silencing suppressor

水稻条纹病毒 (*Rice stripe virus*, RSV) 引起的水稻条纹叶枯病已成为当前我国水稻上分布广泛、为害极大的最重要病毒病之一。RSV 主要通过灰飞虱传播, 寄主范围相对较窄, 主要侵染水稻、小麦、大麦和燕麦等禾本科植物^[1]。RSV 在我国多地持续发生或流行, 其流行原因常与水稻品种分布、种植结构、灰飞虱数量及带毒率有关^[2]。1963 年, RSV 在苏南地区水稻上首次发现, 现已经扩散到安徽、浙江、江西、福建、台湾和云南等 20 余省广大水稻种植区^[3]。近年来, 安徽全省各稻区呈逐年流行趋势, 局部田块发病率达 80% 以上, 造成水稻严重减产^[4]。

RSV 是纤细病毒属 (*Tenuivirus*) 的代表种, 病毒粒子为丝状体 (3~8×290~2 110 nm), 可形成分支的丝状或杆状超螺旋结构^[5]。RSV 是一个多组份 RNA 病毒, 其基因组由 4 条单链 RNA (ssRNA) 组成, 分别命名为 RNA1、RNA2、RNA3 和 RNA4。RNA1 通过负义链编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp), 而其他 3 个组份均采用双义链编码策略, RNA2 编码非结构蛋白 NS2 和 NSvc2, RNA3 编码 CP 蛋白和 NS3 蛋白, RNA4 编码运动蛋白 NSvc4 和病害特异蛋白 SP^[6-8]。

RSV 的遗传多样性是由于基因组的变异引起的, 只有比较基因组序列的变异才能从根本上了解 RSV 各个株系差异的本质。RSV 致病性差异与地理分布及其基因组变异存在一定的相关性^[9]。根据不同地区 RSV 分离物的 CP、SP、NS2 和 NS3 基因的遗传多样性分析认为, 我国主要存在着 2 个 RSV 亚种群, 即云南地区 RSV 亚种群和云南以外地区 RSV 亚种群^[7,10-12]。RSV 部分基因在遗传上相对保守, 除了 CP 基因, NS3 基因核苷酸序列相似性也能够一定程度上反映 RSV 全基因组的变异和分子进化情况。为了深入研究安徽 RSV 的基因组变异以及遗传多样性, 本研究克隆了 RSV 安徽分离物的 NS3 基因, 并初步验证了该基因的功能。

1 材料与amp;方法

1.1 样本来源

从安徽省马鞍山水稻产区采集样本, 水稻叶片

呈现典型不规则黄绿色条斑症状, 新鲜样本保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 质粒、菌株和植物材料

克隆载体 pMD18-T simple Vector 购自大连宝生物公司, 植物表达载体 pBIN438、大肠杆菌 (*Escherchia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105、含 pBIN-GFP 的农杆菌、含 pBIN-HC-Pro 的农杆菌、本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和 16c 本氏烟 (转 *GFP* 基因本氏烟 16c 株系) 由安徽农业大学病毒实验室保存。

1.3 试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等工具酶均购自大连宝生物公司, TRIzol 购自 Invitrogen 公司, 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物, HiFi-MMLV cDNA 反转录试剂盒购自北京康为生物公司; 其他药品均为国药公司分析纯。

1.4 总 RNA 提取

选择 1 个安徽马鞍山水稻样本提取总 RNA, 取冻存水稻的病叶 0.1 g, 液氮条件下充分研磨, 然后用 TRIzol 试剂盒提取病叶总 RNA, 方法按试剂公司提供的产品说明书进行。

1.5 引物设计与合成

从 GenBank 下载 RSV RNA3 片段的序列, 根据 NS3 基因两侧的保守序列设计一对特异性引物。RNA3/F1: 5'-CAATACAATTCCGACATCATC-3', RNA3/R1: 5'-TAAGGATTGCCAATCATGG-3'。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.6 RSV RNA3 部分片段的克隆和测序

cDNA 第一链的合成参考 Fermentas 逆转录试剂盒说明, 在 M-MLV 逆转录酶作用下, 以 RNA3/R1 为下游引物合成 cDNA 第一链。再以 cDNA 第一链为模板, 用引物 RNA3/F1、RNA3/R1 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94℃ 45 s, 53℃ 45 s, 72℃ 65 s, 30 个循环。利用回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD18-T simple Vector 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 菌落 PCR 筛选阳性克隆。阳性克隆送上海英潍捷基生物公司测序。

1.7 RSV RNA3 部分片段的序列分析

利用软件 DNASTar 和 DNAMAN Version 5.22 进行序列处理、分析。多序列比较采用 DNASTar Clustal V 方法, 系统关系树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法 (Neighbor-joining)。用于序列比较和系统关系树构建的各个 RSV 分离物来源及其 NS3 基因 GenBank 登录号见表 1。

1.8 沉默抑制子的鉴定

1.8.1 引物设计与合成 根据 1.6 已测序的 RSV RNA3 部分片段设计特异性引物, 为了方便构建表

达载体, 在 2 个引物的 5'端引入不同酶切位点。NS3-F: 5'-GCGGATCCATGAACGTGTTTCACATCG TCTG-3', NS3-R: 5'-GCGTTCGACCTACAGCACAG CTGGAGAG-3'。上游引物下划线处为 *Bam*HI 酶切位点, 下游引物下划线处为 *Sal*I 酶切位点。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.8.2 NS3 基因的克隆 以 1.6 获得的 RSV RNA3 部分片段克隆为模板, 用引物 NS3-F、NS3-R 进行 PCR 扩增, 回收、连接和转化, 筛选出阳性克隆 pMD-NS3。

表 1 RSV 分离物来源及其 NS3 基因 GenBank 登录号

Table 1 Sources of RSV isolates and their GenBank accession numbers of gene NS3

分离物 Isolate	来源地 Origin	GenBank 登录号 Accession number in GenBank
T1	日本 Japan	NC_003776
Kohnosu	日本 Japan	D01094
0S-JSHA03	江苏海安 Hai'an, Jiangsu Province	EF198730
LS-JSJJ03	江苏靖江 Jingjiang, Jiangsu Province	EF493242
SD-JN2	山东济宁, Jining, Shandong Province	DQ108406
LS-SDJN052	山东济宁 Jining, Shandong Province	EF493240
Zhejiang	浙江 Zhejiang Province	DQ333944
ZJ	浙江 Zhejiang Province	AY284941
SM	福建三明 Sanming, Fujian Province	AY284936
JD	上海嘉定 Jiading, Shanghai	AY284944
DW	辽宁大洼 Okubo, Liaoning Province	AF509500
FYi04	云南 Yunnan Province	AJ875058
YXi1	云南玉溪 Yuxi, Yunnan Province	AJ620318
CXi	云南楚雄 Chuxiong, Yunnan Province	AJ620299
YBS07	云南保山 Baoshan, Yunnan Province	EU931500
YWS	云南巍山 Weishan, Yunnan Province	FM242703

1.8.3 植物表达载体的构建及农杆菌转化 用 *Bam*HI、*Sal*I 双酶切 pMD-NS3, 回收目的片段 NS3, 与同样双酶切的植物表达载体 pBIN 438 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 并筛选阳性克隆。测序验证重组植物表达载体 pBIN-NS3 携带的 NS3 基因序列是否发生突变, 再用电击法转化农杆菌 EHA105。

1.8.4 农杆菌共浸润接种 将含 pBIN-NS3 的农杆菌和含 pBIN-GFP 的农杆菌等比例混合, 共浸润 16c 本氏烟。

1.8.5 GFP 荧光观察与拍照 浸润 6 d 后, 黑暗条件下, 利用手提式长波长紫外灯 (254 nm, 100 W Black Ray model B 100AP, UVP, Upland, CA) 检测 GFP 荧光强弱, 并用带有 UV 和黄色滤光片数码相机拍照。

2 结果与分析

2.1 RSV 安徽分离物 RNA3 部分片段的 RT-PCR 扩增

以同一个安徽马鞍山水稻样本的 cDNA 第一链

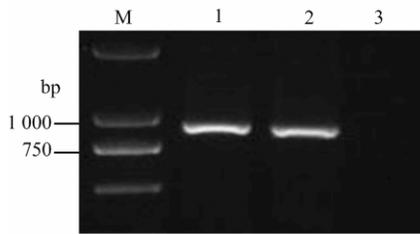
为模板, 用引物 NS3/F、NS3/R 进行 PCR 扩增, 2 个重复样均可扩增出 1 条约 900 bp 的特异性片段, 条带大小与预期结果相符 (图 1)。

2.2 RSV 安徽分离物 RNA3 部分片段克隆和测序

将 RSV 安徽分离物 RNA3 部分片段克隆并测序, 序列全长 874 nts, 含有完整的 NS3 基因, NS3 基因序列长度为 636 nts, 编码 211 个氨基酸。序列的 GenBank 登录号为: FN650796。

2.3 NS3 基因的序列比较及分子进化分析

利用 DNASTar 软件将本研究获得的 RSV 安徽分离物 NS3 基因 (AH-MAS) 与 GenBank 已登录的其它来源的 RSV NS3 基因进行核苷酸序列相似性比较, 结果发现 (表 2), AH-MAS 与来源于华东各省市、辽宁以及日本的 RSV 分离物 NS3 基因间的序列相似性较高, 为 97.5%~99.4%, 而与 5 个 RSV 云南分离物 NS3 基因间的序列相似性相对较低, 为 93.4%~95.4%。其中与来源于华东各省市 8 个 RSV 分离物 NS3 基因间序列相似性高达 97.6%~99.4%。



M. DNA marker; 1-2. RSV RNA3 部分片段; 3. 阴性对照

M. DNA Marker; 1-2. RNA3 partial fragment; 3. Negative control

图 1 RSV RNA3 部分片段的 RT-PCR 产物

Figure 1 RT-PCR products of RSV RNA3 partial fragment

表 2 RSV 安徽分离物 NS3 基因与其他 16 个 RSV 分离物 NS3 基因核苷酸序列的相似性

Table 2 Nucleotide sequence similarity between NS3 gene of RSV Anhui isolate and other 16 RSV isolates

分离物 Isolates	序列相似性/% Sequence similarity
T1	97.5
Kohnosu	98.0
OS-JSHA03	99.4
LS-JSJJ03	99.4
SD-JN2	99.1
LS-SDJN052	98.7
Zhejiang	99.1
ZJ	98.3
SM	98.6
JD	97.6
DW	98.0
FYi04	94.3
YXi1	94.5
CXi	93.4
YBS07	95.4
YWS	95.4

构建 RSV 安徽分离物 NS3 基因 (AH-MAS) 与 16 个其他来源的 RSV NS3 基因的系统关系树。结果发现 (图 2), 所有的 17 个 RSV NS3 基因聚成 2 个分支, AH-MAS 与来源于华东各省市、辽宁以及日本的 RSV 分离物 NS3 基因聚成一个分支, 5 个 RSV 云南分离物 NS3 基因聚成另一个分支, 其中来源于华东各省市 9 个 RSV 分离物 NS3 基因单独聚成一个亚分支。

2.4 沉默抑制子的鉴定

2.4.1 NS3 基因的克隆 以 RSV RNA3 部分片段克隆为模板, 用引物 NS3-F、NS3-R 进行 PCR 扩增, 2 个重复样均可扩增出 1 条约 700 bp 的特异性片段 (图 3)。克隆并测序, 序列比对结果证明, 插入 pMD-NS3 的 NS3 基因序列没有发生变异。

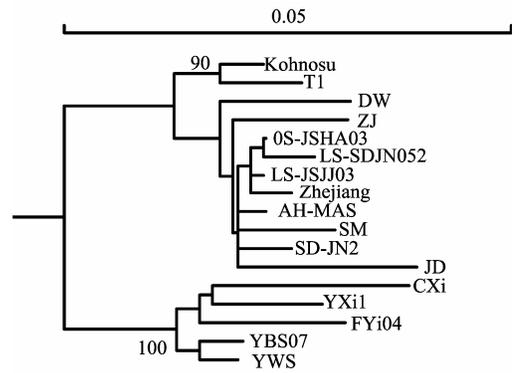
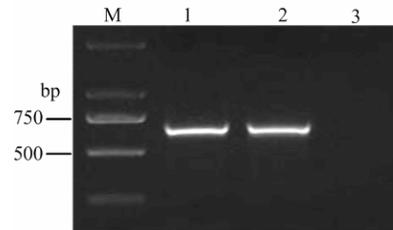


图 2 RSV 安徽分离物 NS3 基因与其它 16 个 RSV NS3 基因核苷酸序列构建的系统关系树

Figure 2 Relationship dendrogram based on the alignment of nucleotide sequences of NS3 genes of RSV Anhui isolate and other 16 RSV isolates

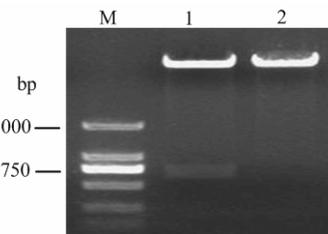


M. DNA marker; 1-2. RSV NS3; 3. 阴性对照

M. DNA marker; 1-2. RSV NS3; 3. Negative control

图 3 RSV NS3 基因的 PCR 产物

Figure 3 PCR products of RSV NS3



M. DNA marker; 1. *Bam*H I、*Sal* I 双酶切 pBIN-NS3; 2. 重组质粒 pBIN-NS3

M. DNA Marker; 1. pBIN 438-NS3 digested with *Bam*H I and *Sal* I; 2. Recombinant plasmid pBIN 438-NS3

图 4 重组质粒 pBIN-NS3 的限制性酶切电泳图谱

Figure 4 Electrophoresis patterns of recombinant plasmid pBIN-NS3 digested with restriction endonuclease enzymes

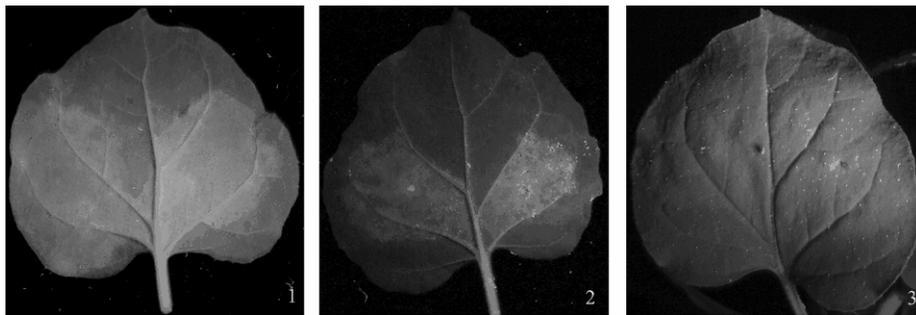
2.4.2 植物表达载体的构建 经双酶切体系验证, 酶切片段大小符合理论值 (图 4), 说明重组植物表达载体 pBIN-NS3 中 NS3 基因阅读框是正确的, 第 2 次测序进一步验证 NS3 基因序列未发生突变。

2.4.3 RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白能抑制 GFP 基因的局部沉默 目前最常的鉴定植物病毒沉默抑制子的体系为农杆菌共浸润 RNA 沉默瞬时抑制体

系。将待鉴定的病毒基因插入植物表达载体 35S 启动子的下游并转化农杆菌，与含 35S:GFP 的农杆菌等比例混合，浸润接种 16c GFP 转基因本氏烟叶片。如果与 35S:GFP 共浸润的病毒基因表达的蛋白能抑制 GFP 基因沉默，则在叶片浸润区能够产生大量 GFP 蛋白，浸润区表现出强烈的绿色荧光，从而可鉴定此病毒基因编码的蛋白为 RNA 沉默抑制子^[13]。由于此体系简便、快速，目前已广泛应用于植物病毒 RNA 沉默抑制子的鉴定。

本研究将含 pBIN-NS3 (35S : NS3) 的农杆菌和含 pBIN-GFP (35S:GFP) 的农杆菌共浸润 16c 本氏烟，阳性对照为含 pBIN-HC-Pro (35S:HC-Pro)

的农杆菌和含 pBIN-GFP (35S:GFP) 的农杆菌共浸润 16c 本氏烟，阴性对照为含空载体 pBIN 438 的农杆菌和含 pBIN-GFP (35S:GFP) 的农杆菌共浸润 16c 本氏烟。浸润 6 d 后在紫外灯下观察发现(图 5)，阴性对照 pBIN438+pBIN-GFP 共浸润区与非浸润区界限不明显，基本看不出绿色荧光，浸润区表现为 GFP 基因的局部沉默；pBIN-NS3+pBIN-GFP 共浸润区以及阳性对照 pBIN-HC-Pro+pBIN-GFP 共浸润区均表现出强烈的绿色荧光，说明 GFP 局部沉默被抑制，从而初步证明 RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白是一个 RNA 沉默抑制子。



含 pBIN-GFP 的农杆菌分别和含其他各个构建的农杆菌共浸润 16c 本氏烟植株叶片。1. pBIN-NS3+pBIN-GFP; 2. pBIN-HC-Pro + pBIN-GFP; 3. pBIN438 + pBIN-GFP

The leaves of *N. benthamiana* line 16c plants were co-infiltrated with *A. tumefaciens* mixtures carrying pBIN-GFP and other constructs. 1. pBIN-NS3 + pBIN-GFP; 2. pBIN-HC-Pro + pBIN-GFP; 3. pBIN438 + pBIN-GFP

图 5 RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白抑制 GFP 基因的局部沉默

Figure 5 Suppression of gene GFP local silencing by NS3 protein encoded by RSV Anhui isolate

3 小结与讨论

本研究从安徽马鞍山水稻上克隆了 RSV 安徽分离物 NS3 基因。序列分析表明，该分离物的 NS3 基因与其他来源的 NS3 基因序列相似性为 93.4%~99.4%，这表明由于地理来源不同，RSV NS3 基因存在着一定程度的分子变异。RSV 安徽分离物 NS3 基因与华东各省 RSV 分离物的 NS3 基因间的序列相似性高达 97.6%~99.4%，而且聚成一个单独亚分支，说明华东各省各个 RSV 分离物亲缘关系最近，推测它们可能具有共同的祖先。RSV 安徽分离物与来源于华东各省市、辽宁以及日本的 RSV 分离物 NS3 基因聚成一个分支，5 个 RSV 云南分离物 NS3 基因聚成另一个分支，推测可能与云南为多山地形、容易造成传毒介体灰飞虱的地理隔离有关。构建不同 RSV 分离物 CP 基因的系统关系树，同样分成云南和云南以外地区 2 个亚种群^[10, 14]，而 RSV NS3 基因和 CP 基因聚类分析的结果基本一致，说明 RSV NS3 基因的分子变异也可以在一定程度上反映

出 RSV 的遗传多样性和分子进化情况。

RSV 分布范围广，在自然界寄主种类众多，其致病性与寄主种类多样性、灰飞虱传毒特性、生态环境的差异等因素都有一定的相关性^[15]。不同地理来源 RSV 分离物致病性存在明显的分化，甚至同一地理来源的 RSV 不同分离物致病性都有一定的差异^[16]。病毒的致病性与寄主品种的抗病性是一对矛盾体，品种抗病性鉴定需要选择该品种推广地区的病毒株系进行接种。由于病毒易发生分子变异，常导致其致病性发生变化而使品种抗病性丧失，因此，了解 RSV 的遗传多样性及其致病性分化对水稻抗病育种工作具有重要意义。

目前，RSV NS3 基因的功能研究已见报道，研究认为 RSV NS3 基因可能与病毒的复制相关^[17]。熊如意等^[18]进一步证明 NS3 基因是一个 RNA 沉默抑制子，并能够阻止沉默信号长距离传导。RNA 沉默是植物体内固有的一种抗病毒防御反应，而大多数植物病毒自身可以编码 RNA 沉默抑制子克服这种寄主的防卫反应，使植物表现为感病^[19]。RSV 编码

的 NS3 蛋白作为一个病毒 RNA 沉默抑制子, 在病毒和寄主斗争过程中可能协助 RSV 完成对寄主水稻的侵染。由于植物病毒 RNA 沉默抑制子常常是病毒致病性决定因子^[13], 推测 NS3 基因可能具有类似的功能, 直接或间接地影响着 RSV 的致病性。

本研究为了鉴定 RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白是否具有沉默抑制子功能, 利用农杆菌共浸润 RNA 沉默瞬时抑制体系试验发现, RSV 安徽分离物编码的 NS3 蛋白能够强烈抑制 GFP 基因的局部沉默。说明 RSV 安徽分离物的 NS3 基因序列虽然发生了一定程度的分子变异, 但其编码的 NS3 蛋白抑制子功能未变, 而且仍是一个强抑制子。该研究的顺利进行, 为本实验室进一步研究 RSV NS3 基因以及其他基因的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张恒木, 孙焕然, 王华弟, 等. 水稻条纹病毒分子生物学研究进展[J]. 植物保护, 2007, 34 (4): 436-440.
- [2] 任春梅, 程兆榜, 季英华, 等. 灰飞虱来源的水稻条纹病毒病特异性蛋白基因遗传多样性[J]. 华北农学报, 2010, 25 (6): 132-138.
- [3] 周益军, 李硕, 程兆榜, 等. 中国水稻条纹叶枯病研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1007-1015.
- [4] 丁菲, 檀根甲, 贾琳, 等. 水稻条纹病毒安徽分离物 CP 基因的克隆及序列分析[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(3): 417-420.
- [5] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Liang D L, Qu Z C, Ma X Q, et al. Detection and localization of *Rice stripe virus* gene products in vivo[J]. Virus Genes, 2005, 31(2): 211-221.
- [7] Wei T Y, Yang J G, Liao F L, et al. Genetic diversity and population structure of *Rice stripe virus* in China[J]. Journal of General Virology, 2009, 90: 1025-1034.
- [8] Xiong R Y, Wu J X, Zhou Y J, et al. Identification of a movement protein of the *Tenuivirus* Rice stripe virus[J]. Journal of Virology, 2008, 82: 12304-12311.
- [9] 程兆榜, 任春梅, 周益军, 等. 水稻条纹病毒不同地区分离物的致病性研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 126-131.
- [10] 李凡, 杨金广, 吴祖建, 等. 水稻条纹病毒云南分离物 CP 基因克隆及序列比较分析[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(1): 48-51.
- [11] 魏太云, 林含新, 吴祖建, 等. 水稻条纹病毒 NS2 基因遗传多样性分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(5): 600-605.
- [12] 李凡, 杨金广, 龙亚芹, 等. 水稻条纹病毒云南分离物病害特异性蛋白基因的分子变异[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(3): 28-31.
- [13] Brigneti G, Voinnet O, Li W X, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*[J]. The EMBO Journal, 1998, 17: 6739-6746.
- [14] 张世贤, 李莉, 王锡锋, 等. 我国北方稻区水稻条纹病毒分子变异和水稻品种抗病性分析[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 45-50.
- [15] 程文金, 邓慧颖, 谢荔岩, 等. 我国水稻条纹病毒致病性的分化与差异分析[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2009, 38(6): 561-566.
- [16] 林含新, 魏太云, 吴祖建, 等. 我国水稻条纹病毒 7 个分离物的致病性和化学特性比[J]. 福建农业大学学报, 2002, 31(2): 164-167.
- [17] 曲志才, 沈大棱, 邓可京, 等. 水稻条纹病毒基因组组分 4 的克隆与序列分析[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 36-42.
- [18] Xiong R Y, Wu J X, Zhou Y J, et al. Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by Rice stripe tenuivirus[J]. Virology, 2009, 387(1): 29-40.
- [19] Díaz-Pendón J A, Ding S W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis[J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46: 303-326.