分类号：S432.4+1 单位代码：10389

密 级： 学 号：S2090405

**福建农林大学博士学位论文**

**SRBSDV 和 RRSV 在介体飞虱体内的侵染机理**

学 科 门 类：农学

一级学科名称：植物保护学二级学科名称：植物病理学研 究 方 向：植物病毒学研究生姓名： 贾东升

指 导 教 师： 谢联辉 教授

魏太云 研究员

论文完成时间：二○一三年五月

**Thesis for Doctor’s Degree**

**Infection mechanisms of SRBSDV and RRSV in vector planthoppers**

Specialty: Plant Pathology Study field: Plant virology Postgraduate: Dongsheng Jia Advisors: Prof. Lianhui Xie

Prof. Taiyun Wei Submitted time: May, 2013

Fujian Agriculture and Forestry university Fuzhou, Fujian

The People’s Republic of China

**独创性声明**

本人声明，所呈交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名： 日期：

**论文使用授权的说明**

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅; 学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。 □ 不保密，本论文属于不保密。 □

学位（毕业）论文作者亲笔签名： 日期：

指导教师亲笔签名： 日期

目 录

[摘](#_Toc686147743)[要](#_Toc686147743) 5

**[Abstract](#_Toc686147744)** 6

**[1.](#_Toc686147745)** [文献综述](#_Toc686147745) 6

**[1.1](#_Toc686147746)** [南方水稻黑条矮缩病毒](#_Toc686147746) 6

**[1.1.1](#_Toc686147747)** [南方水稻黑条矮缩病毒的致病特征](#_Toc686147747) 6

**[1.1.2](#_Toc686147748)** [南方水稻黑条矮缩病的发生及危害](#_Toc686147748) 6

**[1.1.3](#_Toc686147749)****[SRBSDV](#_Toc686147749)**[的特征及分类地位](#_Toc686147749) 7

**[1.1.4](#_Toc686147750)****[SRBSDV](#_Toc686147750)**[的寄主范围及传播介体](#_Toc686147750) 9

**[1.1.5](#_Toc686147751)****[SRBSDV](#_Toc686147751)**[介体白背飞虱的传毒特性](#_Toc686147751) 9

**[1.1.6](#_Toc686147752)****[SRBSDV](#_Toc686147752)**[的基因组及蛋白功能研究](#_Toc686147752) 9

**[1.2](#_Toc686147753)** [水稻齿叶矮缩病毒](#_Toc686147753) 10

**[1.2.1](#_Toc686147754)** [水稻齿叶矮缩病毒的致病特征](#_Toc686147754) 10

**[1.2.2](#_Toc686147755)** [水稻齿叶矮缩病的发生及危害](#_Toc686147755) 10

**[1.2.3](#_Toc686147756)****[RRSV](#_Toc686147756)**[介体褐飞虱的传毒特性](#_Toc686147756) 10

**[1.2.4](#_Toc686147757)****[RRSV](#_Toc686147757)**[的蛋白功能研究](#_Toc686147757) 10

**[1.3](#_Toc686147758)****[RNA](#_Toc686147758)**[病毒的复制机理](#_Toc686147758) 10

**[1.3.1](#_Toc686147759)****[ssRNA](#_Toc686147759)**[病毒的复制](#_Toc686147759) 10

**[1.3.2](#_Toc686147760)****[dsRNA](#_Toc686147760)**[病毒的复制](#_Toc686147760) 10

**[1.3.3](#_Toc686147761)** [呼肠孤病毒复制场所的研究](#_Toc686147761) 10

**[1.4](#_Toc686147762)** [植物病毒在介体昆虫体内的扩散机理](#_Toc686147762) 10

**[1.4.1](#_Toc686147763)** [病毒在介体内的侵染屏障](#_Toc686147763) 12

**[1.4.2](#_Toc686147764)** [植物病毒的侵染循回过程](#_Toc686147764) 12

**[1.4.3](#_Toc686147765)** [病毒突破侵染屏障的途径](#_Toc686147765) 12

**[1.4.4](#_Toc686147766)** [病毒编码蛋白介导病毒的扩散](#_Toc686147766) 13

**[1.5](#_Toc686147767)****[RNAi](#_Toc686147767)**[原理及其应用](#_Toc686147767) 13

**[1.5.1](#_Toc686147768)****[RNAi](#_Toc686147768)**[现象的发现](#_Toc686147768) 13

**[1.5.2](#_Toc686147769)****[RNAi](#_Toc686147769)**[的作用机理](#_Toc686147769) 13

**[1.5.3](#_Toc686147770)****[RNAi](#_Toc686147770)**[技术的应用](#_Toc686147770) 13

**[1.6](#_Toc686147771)** [昆虫培养细胞的应用](#_Toc686147771) 13

**[1.6.1](#_Toc686147772)** [昆虫培养细胞概况](#_Toc686147772) 13

**[1.6.2](#_Toc686147773)** [昆虫培养细胞的应用](#_Toc686147773) 14

**[1.6.3](#_Toc686147774)** [昆虫培养细胞在植物病毒研究中的应用](#_Toc686147774) 14

**[1.7](#_Toc686147775)** [本研究的目的和意义](#_Toc686147775) 14

**[2.](#_Toc686147776)****[SRBSDV](#_Toc686147776)**[在介体内的侵染循回过程](#_Toc686147776) 14

**[2.1](#_Toc686147777)** [材料与试剂](#_Toc686147777) 14

**[2.1.1](#_Toc686147778)** [水稻病毒毒源和介体昆虫](#_Toc686147778) 14

**[2.1.2](#_Toc686147779)** [实验试剂与抗体](#_Toc686147779) 14

**[2.2](#_Toc686147780)** [实验方法](#_Toc686147780) 15

**[2.2.1](#_Toc686147781)** [提纯抗体](#_Toc686147781)**[IgG](#_Toc686147781)** 15

**[2.2.2](#_Toc686147782)** [荧光抗体的交联](#_Toc686147782) 15

**[2.2.3](#_Toc686147783)** [白背飞虱和灰飞虱取食](#_Toc686147783)**[SRBSDV](#_Toc686147783)** 15

**[2.2.4](#_Toc686147784)** [解剖介体昆虫消化系统器官](#_Toc686147784) 15

**[2.2.5](#_Toc686147785)** [免疫荧光检测](#_Toc686147785) 15

**[2.3](#_Toc686147786)** [结果与分析](#_Toc686147786) 15

**[2.3.1](#_Toc686147787)** [白背飞虱消化系统](#_Toc686147787) 15

**[2.3.2](#_Toc686147788)****[SRBSDV](#_Toc686147788)**[在白背飞虱消化系统的侵染循回过程](#_Toc686147788) 16

**[2.3.3](#_Toc686147789)****[SRBSDV](#_Toc686147789)**[在灰飞虱消化系统的分布](#_Toc686147789) 16

**[2.4](#_Toc686147790)** [讨论](#_Toc686147790) 16

**[3.](#_Toc686147791)****[P9-1](#_Toc686147791)**[蛋白参与](#_Toc686147791)**[SRBSDV](#_Toc686147791)**[的复制](#_Toc686147791) 16

**[3.1](#_Toc686147792)** [材料与试剂](#_Toc686147792) 17

**[3.1.1](#_Toc686147793)** [毒源和虫源](#_Toc686147793) 17

**[3.1.2](#_Toc686147794)** [菌株、载体和昆虫培养细胞](#_Toc686147794) 17

**[3.1.3](#_Toc686147795)** [试剂与抗体](#_Toc686147795) 17

**[3.2](#_Toc686147796)** [实验方法](#_Toc686147796) 17

**[3.2.1](#_Toc686147797)****[P9-1](#_Toc686147797)**[抗体制备](#_Toc686147797) 17

**[3.2.2](#_Toc686147798)****[P9-1](#_Toc686147798)**[和](#_Toc686147798)**[P9-1ΔC](#_Toc686147798)**[蛋白在](#_Toc686147798)**[Sf9](#_Toc686147798)**[细胞中的表达](#_Toc686147798) 18

**[3.2.3](#_Toc686147799)****[P9-1](#_Toc686147799)**[蛋白在白背飞虱培养细胞中的表达](#_Toc686147799) 19

**[3.2.4](#_Toc686147800)****[dsP9-1](#_Toc686147800)**[对病毒在培养细胞中复制的影响](#_Toc686147800) 20

**[3.2.5](#_Toc686147801)****[dsP9-1](#_Toc686147801)**[对病毒在昆虫消化系统复制的影响](#_Toc686147801) 21

**[3.3](#_Toc686147802)** [结果与分析](#_Toc686147802) 24

**[3.3.1](#_Toc686147803)****[P9-1](#_Toc686147803)**[蛋白的抗体制备与检测](#_Toc686147803) 24

**[3.3.2](#_Toc686147804)****[P9-1](#_Toc686147804)**[蛋白在](#_Toc686147804)**[Sf9](#_Toc686147804)**[细胞中的表达](#_Toc686147804) 24

**[3.3.3](#_Toc686147805)****[P9-1](#_Toc686147805)**[蛋白在白背飞虱培养细胞中的表达](#_Toc686147805) 24

**[3.3.4](#_Toc686147806)****[dsP9-1](#_Toc686147806)**[对病毒在培养细胞中复制的影响](#_Toc686147806) 25

**[3.3.5](#_Toc686147807)****[dsP9-1](#_Toc686147807)**[对病毒在昆虫体内复制的影响](#_Toc686147807) 25

**[3.3.6](#_Toc686147808)** [饲喂](#_Toc686147808)**[dsP9-1](#_Toc686147808)**[阻碍白背飞虱传播](#_Toc686147808)**[SRBSDV](#_Toc686147808)** 26

**[3.4](#_Toc686147809)** [讨论](#_Toc686147809) 27

**[4.](#_Toc686147810)****[P7-1](#_Toc686147810)**[蛋白参与](#_Toc686147810)**[SRBSDV](#_Toc686147810)**[的扩散](#_Toc686147810) 28

**[4.1](#_Toc686147811)** [材料与试剂](#_Toc686147811) 28

**[4.1.1](#_Toc686147812)** [毒源和虫源](#_Toc686147812) 28

**[4.1.2](#_Toc686147813)** [菌株、载体和昆虫培养细胞](#_Toc686147813) 28

**[4.1.3](#_Toc686147814)** [试剂与抗体](#_Toc686147814) 28

**[4.2](#_Toc686147815)** [实验方法](#_Toc686147815) 28

**[4.2.1](#_Toc686147816)** [抗体制备](#_Toc686147816) 28

**[4.2.2](#_Toc686147817)****[P7-1](#_Toc686147817)**[蛋白在白背飞虱培养细胞中的定位](#_Toc686147817) 29

**[4.2.3](#_Toc686147818)****[dsP7-1](#_Toc686147818)**[对病毒在培养细胞中扩散的影响](#_Toc686147818) 29

**[4.2.4](#_Toc686147819)****[P7-1](#_Toc686147819)**[蛋白在白背飞虱消化系统的扩散途径](#_Toc686147819) 29

**[4.2.5](#_Toc686147820)** [验证](#_Toc686147820)**[P7-1](#_Toc686147820)**[与白背飞虱](#_Toc686147820)**[Actin](#_Toc686147820)**[的互作](#_Toc686147820) 29

**[4.2.6](#_Toc686147821)****[dsP7-1](#_Toc686147821)**[对病毒在昆虫消化系统扩散的影响](#_Toc686147821) 31

**[4.3](#_Toc686147822)** [结果与分析](#_Toc686147822) 33

**[4.3.1](#_Toc686147823)****[P7-1](#_Toc686147823)**[蛋白的抗体制备与检测](#_Toc686147823) 33

**[4.3.2](#_Toc686147824)****[P7-1](#_Toc686147824)**[蛋白在培养细胞中的定位](#_Toc686147824) 33

**[4.3.3](#_Toc686147825)****[P7-1](#_Toc686147825)**[蛋白参与病毒在细胞间的扩散](#_Toc686147825) 33

**[4.3.4](#_Toc686147826)****[dsP7-1](#_Toc686147826)**[抑制管状结构的形成和病毒在细胞间的扩散](#_Toc686147826) 34

**[4.3.5](#_Toc686147827)****[P7-1](#_Toc686147827)**[蛋白在白背飞虱消化系统的扩散途径](#_Toc686147827) 34

**[4.3.6](#_Toc686147828)****[P7-1](#_Toc686147828)**[蛋白在中肠表面的扩散方式](#_Toc686147828) 34

**[4.3.7](#_Toc686147829)****[P7-1](#_Toc686147829)**[蛋白与白背飞虱](#_Toc686147829)**[Actin](#_Toc686147829)**[的互作](#_Toc686147829) 34

**[4.3.8](#_Toc686147830)****[dsP7-1](#_Toc686147830)**[阻碍病毒在白背飞虱消化系统的扩散](#_Toc686147830) 35

**[4.3.9](#_Toc686147831)** [饲喂](#_Toc686147831)**[dsP7-1](#_Toc686147831)**[阻碍白背飞虱传播](#_Toc686147831)**[SRBSDV](#_Toc686147831)** 37

**[4.4](#_Toc686147832)** [讨论](#_Toc686147832) 38

**[5.](#_Toc686147833)** [RRSV在褐飞虱体内的侵染循回和复制](#_Toc686147833) 39

**[5.1](#_Toc686147834)** [材料与方法](#_Toc686147834) 39

**[5.1.1](#_Toc686147835)** [水稻病毒毒源和介体昆虫](#_Toc686147835) 39

**[5.1.2](#_Toc686147836)** [实验试剂与抗体](#_Toc686147836) 39

**[5.2](#_Toc686147837)** [实验方法](#_Toc686147837) 39

**[5.2.1](#_Toc686147838)** [褐飞虱饲毒](#_Toc686147838) 39

**[5.2.2](#_Toc686147839)** [免疫荧光标记](#_Toc686147839)**[RRSV](#_Toc686147839)**[在褐飞虱消化系统的分布](#_Toc686147839) 39

**[5.2.3](#_Toc686147840)****[RRSV](#_Toc686147840)**[编码非结构蛋白在](#_Toc686147840)**[Sf9](#_Toc686147840)**[细胞中的表达](#_Toc686147840) 39

**[5.2.4](#_Toc686147841)** [电镜观察](#_Toc686147841)**[Pns10](#_Toc686147841)**[蛋白在褐飞虱唾液腺中的定位](#_Toc686147841) 39

**[5.2.5](#_Toc686147842)****[dsPns10](#_Toc686147842)**[对](#_Toc686147842)**[RRSV](#_Toc686147842)**[在昆虫体内复制的影响](#_Toc686147842) 39

**[5.3](#_Toc686147843)** [结果与分析](#_Toc686147843) 41

**[5.3.1](#_Toc686147844)****[RRSV](#_Toc686147844)**[在褐飞虱消化系统的侵染循回过程](#_Toc686147844) 41

**[5.3.2](#_Toc686147845)****[RRSV](#_Toc686147845)**[非结构蛋白在](#_Toc686147845)**[Sf9](#_Toc686147845)**[细胞中的表达](#_Toc686147845) 41

**[5.3.3](#_Toc686147846)****[Pns10](#_Toc686147846)**[在褐飞虱体内的定位](#_Toc686147846) 41

**[5.3.4](#_Toc686147847)****[Pns10](#_Toc686147847)**[参与](#_Toc686147847)**[RRSV](#_Toc686147847)**[在褐飞虱体内的侵染和复制](#_Toc686147847) 42

**[5.4](#_Toc686147848)** [讨论](#_Toc686147848) 44

[全文小结与展望](#_Toc686147849) 44

[展 望](#_Toc686147850) 45

[参考文献](#_Toc686147851) 45

[个人简介](#_Toc686147852) 51

摘 **要**

近年来由南方水稻黑条矮缩病毒（Southern rice black-streaked dwarf virus,

SRBSDV）引起的南方水稻黑条矮缩病在我国南方稻区暴发流行，已成为我国目前水稻（*Oryza sativa*）生产上的重要病害之一。同时由水稻齿叶矮缩病毒（*Rice ragged stunt virus*, RRSV）引起的水稻齿叶矮缩病也在我国南方稻区蔓延发生。

SRBSDV是一种新发现的水稻病毒，属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）斐济病毒属（*Fijivirus*）的一个暂定种，由新的介体白背飞虱（*Sogatella furcifera*）以持久增殖型方式传播。RRSV是一种再次发生的老病毒，是呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）水稻病毒属（*Oryzavirus*）的代表种，由介体褐飞虱（*Nilaparvata lugens*）以持久增殖型方式传播。目前，国内的科研工作者已对这两种水稻病毒的介体传毒特性做了大量的研究，然而关于病毒在介体飞虱体内的侵染机理知之甚少，有关病毒在介体体内的侵染循回过程以及复制和扩散机理还未曾报道。

本研究首先通过免疫荧光标记技术系统研究了SRBSDV在其介体昆虫体内的侵染循回过程。明确了SRBSDV在白背飞虱取食过程中首先进入中肠肠腔；随后少量的病毒粒体侵入中肠上皮细胞并进行复制；增殖后的病毒从中肠上皮细胞向中肠表面的肌肉组织扩散；病毒在中肠表面沿着环肌和纵肌向邻近的器官扩散；饲毒后6 d，部分白背飞虱体内SRBSDV已通过血淋巴扩散到唾液腺；饲毒后8 d，病毒在白背飞虱唾液腺中大量增殖，达到了系统性侵染，从而完成了整个侵染循回过程。SRBSDV与白背飞虱和灰飞虱的亲和性具有明显的差别，这可能与病毒在两种介体体内的侵染循回过程不同有关。通过共聚焦显微镜观察

SRBSDV在饲毒后25 d的灰飞虱消化系统的分布，发现灰飞虱的中肠内可以检测到病毒，但在唾液腺中检测不到病毒，明确了SRBSDV受到中肠释放屏障的阻碍无法扩散到唾液腺，从而不能被灰飞虱有效传播。

SRBSDV在介体昆虫内的侵染会诱导形成提供病毒复制和装配场所的球状或纤维状的电子致密内含体——病毒原质（viroplasm）。为进一步研究SRBSDV在介体昆虫体内的侵染和增殖机制，本研究在SRBSDV侵染的白背飞虱培养细胞中观察到病毒编码的非结构蛋白P9-1分布在病毒原质基质中。子代病毒粒体和病毒复制产生的病毒RNA积累在P9-1分布的病毒原质基质中。在体外体系中，SRBSDV P9-1可独立形成类似于病毒原质基质的内含体。这些结果表明，SRBSDV P9-1是形成病毒原质基质的必需组分，形成的病毒原质是SRBSDV进行病毒RNA复制和病毒粒体装配的场所。为了进一步验证SRBSDV P9-1在病毒侵染介体过程中的功能，本研究首次将人工合成dsRNA诱导的RNAi技术与白背飞虱培养细胞技术相结合研究P9-1的功能。通过转染针对P9-1基因的人工

合成的dsRNA干扰P9-1基因在介体培养细胞中的表达显著抑制病毒原质的形成和病毒在细胞中的侵染。将人工合成的P9-1基因dsRNA通过膜饲喂法饲喂白背飞虱，抑制了SRBSDV在白背飞虱体内的侵染和复制，从而阻碍了白背飞虱传播病毒。因此，SRBSDV P9-1是病毒在介体昆虫体内有效侵染和复制所必需的。

SRBSDV侵染白背飞虱后必须从初侵染的中肠上皮细胞扩散到唾液腺才能被介体有效传播，因此病毒在介体内的扩散也是其完成侵染循回的关键环节。本研究在SRBSDV侵染的白背飞虱培养细胞中观察到由非结构蛋白P7-1形成的包裹着病毒粒体的管状结构可伸出侵染细胞的表面。在体外实验中，单独表达的P7-1能在Sf9细胞中形成伸出细胞的小管结构，推测其参与病毒在介体昆虫体内的扩散。为了验证P7-1蛋白在病毒扩散过程中的作用，本研究通过病毒抗体中和培养细胞中游离病毒粒体后，仍可观察到P7-1管状结构从初次侵染的细胞延伸到邻近的健康细胞。体外转染人工合成的针对P7-1基因的dsRNA有效抑制P7-1管状结构的形成，阻碍SRBSDV在细胞间的扩散，表明P7-1管状结构是

SRBSDV在白背飞虱培养细胞间安全扩散的重要通道。

P7-1管状结构是否介导病毒在白背飞虱体内扩散？通过免疫荧光标记分析发现P7-1管状结构在白背飞虱体内的扩散途径与病毒的侵染循回过程一致，P7-1管状结构从白背飞虱中肠上皮细胞首先扩散到中肠表面的环肌，并沿着环肌横向扩散，当遇到与环肌交叉的纵肌后开始沿着纵肌纵向扩散，最后扩散到整个中肠和邻近器官的表面。在P7-1管状结构到达的部位病毒才能进行复制，病毒的复制滞后于P7-1管状结构的扩散。通过酵母双杂交系统和免疫共沉淀技术发现P7-1与肌动蛋白（Actin）存在特异性互作。因此，P7-1管状结构具备了在消化道外层肌纤维上运动的能力。通过膜饲喂法饲喂人工合成的针对P7-1基因的dsRNA，有效抑制P7-1管状结构的形成，阻碍病毒在白背飞虱体内的扩散，最终阻碍了白背飞虱传播SRBSDV的能力，表明SRBSDV P7-1是病毒在白背飞虱体内有效扩散所必需的。

本研究对RRSV在其介体褐飞虱体内的侵染循回过程和复制机理进行了分析。首先通过免疫荧光标记技术明确了RRSV在褐飞虱体内的侵染循回途径与

SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回途径大体相似。在病毒侵染褐飞虱过程中，由非结构蛋白Pns10诱导形成的病毒原质在中肠上皮细胞、中肠外层肌肉组织和唾液腺等组织均有分布。通过膜饲喂体外合成的针对Pns10基因的dsRNA抑制了病毒原质在介体昆虫体内的形成，阻碍病毒在褐飞虱体内的侵染和复制，证明了Pns10蛋白是RRSV侵染介体褐飞虱所必需的。

综上所述，本研究首次阐明了SRBSDV和RRSV在不同飞虱体内的侵染循回过程；首次将RNAi技术与介体昆虫培养细胞相结合研究植物病毒编码蛋白的功能，明确了SRBSDV非结构蛋白P9-1 和RRSV非结构蛋白Pns10是形成病毒

原质基质的组分，参与病毒在介体内的复制，SRBSDV非结构蛋白P7-1蛋白是形成包裹病毒粒体的管状结构的组分，参与病毒在介体内的扩散。初步解析了

SRBSDV和RRSV适应于相应介体昆虫高效传毒的分子机制，为利用RNAi原理培育转基因水稻防治病毒病的发生提供了靶标基因及理论依据。

**关键词：**南方水稻黑条矮缩病毒；水稻齿叶矮缩病毒；白背飞虱；褐飞虱；侵染循回；复制；扩散；病毒原质；管状结构

**Abstract**

Southern rice black-streaked dwarf disease caused by southern rice black-streaked

Dwarf virus (SRBSDV) has recently prevailed in southern China and become one of the most damaging viral diseases of rice. SRBSDV is a newly proposed *Fijivirus* species in the family *Reoviridae*, which was transmitted mainly by white backed

Planthopper (*Sogatella furcifera*, WBPH) in a persistent propagative manner.

Meanwhile, Rice ragged stunt disease caused by *rice ragged stunt virus* (RRSV) has recently spread in southern China. RRSV is a well-established *Oryzavirus* species in the family *Reoviridae*. It is transmitted by brown planthopper (*Nilaparvata lugens*, BPH), also in a persistent propagative manner. In recent years, transmission characteristics of the two rice viruses by planthoppers have been studied by many researchers in China. However, few studies have been conducted on the mechanisms by which the two viruses infect their vector planthoppers. The infection route, replication and spread of viruses in insect vectors are still poorly understood.

In this study, we investigated the infection route of SRBSDV in the digestive system of WBPH by immunofluorescence. SRBSDV particles initially traveled through the oesophagus into the midgut lumen of WBPH after insect acquisition of the virus from SRBSDV-infected rice plants. Then, only a few virus particles infected and replicated in the epithelial cells of the midgut. At 4 days post-first access to diseased plants (padp), SRBSDV traversed the basal lamina and infected the visceral muscle tissues encircling the midgut epithelium. From then on, SRBSDV spread alone the circular and longitudinal muscles of the midgut to other organs. At 6 days padp, SRBSDV spread to salivary glands in some insects. At 8 days padp, SRBSDV infected the whole alimentary canal and replicated in the salivary glands of WBPH. The compatibility between SRBSDV and WBPH is significantly different from that between SRBSDV and SBPH. It may be related to the different infection route of SRBSDV in different vector insects. The localization of SRBSDV in digestive system of SBPHs at 25 days padp was detected by immunofluorescence microscopy. We could observe SRBSDV within the midgut, but not in the salivary glands of SBPHs. This result suggested that SRBSDV was restricted in midgut and failed to spread into the salivary glands because of the midgut dissemination barrier in SBPHs, which led to the SBPH failed to transmit SRBSDV to rice.

During the infection of SRBSDV, viroplasms, the punctate inclusions for virus replication and assembly of progeny virions, were formed in the alimentary canal and salivary glands of BPHs. To study the infection mechanism of SRBSDV, we used immunofluorescence microscopy to observe the localization of P9-1 in virus- infected VCMs of WBPHs. P9-1 formed punctate inclusions in VCMs, and progeny viral

Particles and viral mRNA accumulated within the viroplasm matrix of P9-1. P9-1 also could form viroplasm-like inclusions in the Sf9 cells. All these results suggested that P9-1 is a constituent of the matrix of viroplasm and viral inclusions formed by P9-1 were the sites for synthesising viral RNA and assembling viral particles. To further confirm the function of P9-1 in viral replication, the RNA interference induced by synthesized dsRNA was used to investigate gene functions of P9-1 in insect culture cells. By knocking down the expression of P9-1 with synthesized dsRNA of P9-1, the formation of viroplasm and viral infection were significantly inhibited in the VCMs. Meanwhile, ingestion of dsRNAs from the P9-1 gene via membrane feeding also strongly inhibited viral infection and replication in intact WBPHs. These results suggested that P9-1 was essential for the infection and replication of SRBSDV in WBPHs.

SRBSDV can only be effectively transmitted when it spread from the midgut epithelial cells, the primary site of virus entry into insect cells, to salivary glands. The spread of SRBSDV in the insect vector plays a crucial role in the infection route. In this study, we observed that the tubular structures formed by non-structure protein P7-1 contained viral particles and scattered the surface of infected cells or extended toward neighboring cells. P7-1 of SRBSDV also has the ability to form tubules growing from the cell surface in the Sf9 cells. Based on these results, we conjectured that the P7-1 was involved in the cell-to-cell transmission of SRBSDV. To determine the function of P7-1 related to the spread of SRBSDV, we blocked the virus that had been released into or was present in VCMs with virus-neutralizing antibodies. The P7-1 tubular structures were also extended from the primary cell toward neighboring healthy cells. When the expression of P7-1 was knocked down by RNAi induced by dsRNA specific for P7-1 gene, the formation of tubules was inhibited and SRBSDV failed to spread to the neighboring cells. All these results suggested that the P7-1 participated in the cell-to-cell spread of SRBSDV in cells of WBPHs.

Whether the P7-1 participates in the spread of SRBSDV in WBPHsWedetectedthelocalizationofP7-1inWBPHsbyconfocalmicroscopy. Thedistribution oftubularstructuresformedbyP7-1iscorrelatedwiththeinfectionrouteofSRBSDV. P7-1firstlyappearedinepithelialcells, thenspreadfromtheepithelialcellstocircularmuscleofmidgutandmovedaloneit. Tubulessubsequentlyspreadtothelongitudinalmusclethatintersectedwithcircularmuscleanddisseminatedfromthemidgutto otherorgans. Virusstartedtoreplicateonthesiteswheretubuleshadarrivedbefore. We confirmedthattheP7-1specificallyinteractedwithActinofWBPHbyyeasttwo

Hybrid experiments and co-immunoprecipitation, suggesting that the tubule formed by P7-1 utilized the interaction with Actin of WBPH to spread on muscle of midgut. When the expression of P7-1 was strongly inhibited by feeding synthesized dsRNA of P7-1 via membrane feeding, the formation of P7-1 tubular structure was inhibited. This prevented the spread of SRBSDV in the digestive system of WBPHs, which resulted in the fact that the tested WBPH failed to transmit virus to rice. All these results suggested that the P7-1 was essential for the spread of SRBSDV in WBPH.

We also determined the infection route and the replication mechanism of RRSV in infected BPHs. We firstly analyzed the infection route of RRSV in BPHs by immunofluorescence and found that it was roughly similar with that of SRBSDV. During the infection of RRSV, non-structure protein Pns10 formed viroplasm in midgut epithelial, muscle and salivary glands of RRSV-infected BPHs. To further confirm the function of Pns10 in viral infection, Second-instar nymphs of BPHs were fed synthesized dsRNA of Pns10 by membrane feeding before acquisition of SRBSDV. As a result, RNAi targeting Pns10 significantly inhibited the formation of viroplasm and prevented viral infection and replication in intact BPHs. These results indicate that Pns10 is essential for infection of RRSV in BPHs.

In all, the infection routes of SRBSDV and RRSV in different vector planthoppers were elucidated for the first time in this study. It was the first time to use RNAi strategy to investigate gene functions of plant viruses in insect culture cells. Using RNAi induced by synthesized dsRNA, we found that P9-1 of SRBSDV and Pns10 of RRSV were the constituent of the viroplasm matrix and were essential for viral replication. Tubular structures formed by P7-1 of SRBSDV contained viral particles and participated in viral spread in insect. These studies are useful for understanding the efficiently transmission mechanism of SRBSDV and RRSV in their vectors, and provided theoretical basis and new targets to control viral diseases of rice by RNAi strategy.

**Key words:** Southern rice black-streaked dwarf virus; *Rice ragged stunt virus*; White backed planthopper; Brown planthopper; Infection route; Replication; Spread; Viroplasm; Tubular structur

# **1.** 文献综述

## **1.1** 南方水稻黑条矮缩病毒

### **1.1.1** 南方水稻黑条矮缩病毒的致病特征

南方水稻黑条矮缩病毒（Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV）引起水稻病害的典型症状为：植株矮化，叶色浓绿，叶尖卷曲，叶脉有脉肿，茎秆生有纵向排列的白色瘤状突起（周国辉等，2010）。其次，病株的须根短小，根系不发达。该病害与由水稻齿叶矮缩病毒（*Rice ragged stunt virus*, RRSV）引起的水稻齿叶矮缩病症状非常相似（谢联辉和林奇英，1980），但典型的区别是

RRSV感染的水稻病株茎秆上只长长短不一的白色线状脉肿，而不长白色的瘤状突起。南方水稻黑条矮缩病在水稻的各生育期均可发病，但不同生育期表现的症状有所不同。苗期感染病害的水稻叶脉长有脉肿，生长严重矮化，叶尖卷曲，部分病株心叶发育畸形，发病严重的植株逐渐枯死；拔节期感染病害的水稻矮缩现象不明显，叶色浓绿，叶鞘和叶脉出现脉肿，茎秆长有白色瘤状突起，根系生长不发达，抽穗后结实率低（Li *et al*., 2012;刘万才等, 2010）。

### **1.1.2** 南方水稻黑条矮缩病的发生及危害

近年来南方水稻黑条矮缩病在我国南方稻区时有流行，已成为我国水稻

（*Oryza sativa*）生产上的重要病害之一。该病于2001年在我国广东省阳江市首次发现（周国辉等，2008），发病面积仅3-5 公顷，随后几年间逐渐扩散到广西、海南、湖南、江西、福建等省份。2009年，该病害在我国南方9个省份大面积暴发，受灾面积约30万hm2以上，其中约6 500 hm2 绝收（张松柏等，2010；

曹杨等，2011；周国辉等，2010），同年该病害在越南北部19个省份也普遍发生

（郭荣等，2010）。2010 年，我国南方13个省份超过130万hm2水稻受害，同期越南中部和北方29个省份约6万hm2水稻受害（欧高才等，2012；翟保平等，

2011）。近两年，南方水稻黑条矮缩病在我国的发生相对减轻，但在多个省份尚有局部的发生，对水稻生产仍具有潜在的威胁。此外，该病害不仅可以侵染水稻，还可以危害玉米，2009 年在ft东、广东、广西和海南等省的玉米上也检测到

SRBSDV，并造成玉米植株的矮缩和不结穗（刘万才等，2010）。

### **1.1.3** **SRBSDV**的特征及分类地位

SRBSDV粒体为正二十面体球状，为双层壳结构，直径约70-75nm。基因组由10条dsRNA组成，按照基因组在PAGE凝胶电泳的迁移速率从慢到快分别命名为S1-S10（周国辉等，2008）。根据病毒粒体形态、基因组结构、寄主范围和介体传毒特性等特征，SRBSDV被划分为呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）斐济病毒

属（*Fijivirus*）的一个暂定种，与水稻黑条矮缩病毒（*Rice black streaked dwarf virus*,

RBSDV）、玉米粗缩病毒（*Maize rough dwarf virus*）、马唐草矮化病毒（*Pangola stunt virus*）和马德里约柯托病毒（*Mal de Rio Cuarto virus*, MRCV）属于同一个亚组（表1-1）。同属的病毒还包括燕麦不孕矮缩病毒（*Oat sterile dwarf virus*）、斐济病病毒（*Fiji disease virus*）、大蒜矮缩病毒（*Garlic dwarf virus*）和褐飞虱呼肠孤病毒（*Nilaparvata lugens reovirus*）（Wang *et al*., 2010; Attoui *et al*., 2012）。

表1-1 植物呼肠孤病毒的分类

Table 1-1. Classification of plant-infecting reoviruses

| 科（Family） | 属（Genus） | 种（species） | 主要介体（vector） |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 斐济病病毒（Fiji disease virus） | 扁角飞虱（Perkinsiella  saccharicida) |
|  |  | 水稻黑条矮缩病毒（Rice black  Streaked dwarf virus) | 灰飞虱（Laodelphax  striatellus) |
|  | 斐济病毒属  （Fijivirus） | 南方水稻黑条矮缩病毒（Southern  Rice black-streaked dwarf virus) | 白背飞虱（Sogatella  furcifera) |
| 马德里约柯托病毒  (Mal de Rio Cuarto virus) | 飞虱（Delphacodes  kuscheli) |
|  |  | 玉米粗缩病毒  (Maize rough dwarf virus) | 灰飞虱（Laodelphax striatellus） |
| 呼肠孤病毒科  （Reoviridae） |  | 燕麦不孕矮缩病毒  (Oat sterile dwarf virus) | 飞虱  (Javesella pellucida) |
|  |  | 大蒜矮缩病毒（Garlic dwarf virus） | 未知 |
|  | 水稻病毒属  （Oryzavirus） | 水稻锯齿叶矮缩病毒  (Rice ragged stunt virus) | 褐飞虱（Nilaparvata  lugens) |
|  | 稗草齿叶矮缩病毒  (Echinochloa ragged stunt virus) | 稗飞虱（Delphacodes  panicicol) |
|  | 植物呼肠孤病毒属  (Phytoreovirus) | 水稻矮缩病毒  (Rice dwarf virus) | 黑尾叶蝉（Nephotettix  cincticeps) |
|  | 水稻瘤矮病毒  (Rice gall dwarf virus) | 电光叶蝉（Recilia  dorsalis) |
|  |  | 伤瘤病毒（Wound tumor virus） | 大叶蝉（Agalliopsis  novella) |

### **1.1.4** **SRBSDV**的寄主范围及传播介体

SRBSDV的寄主植物主要是禾本科的水稻，其次还有玉米(*Zea mays*)、稗草(*Echinochloa crusgalli*)、白草（*Pennisetum flaccidum*）、水莎草（*Juncellus serotinus*）高粱（*Sorghum bicolor*）、野燕麦（*Avena fatua L.*）和牛筋草（*Eleusine indica*）等（周国辉等，2008；朱俊之等，2012）。

SRBSDV的主要传播介体是白背飞虱（*Sogatella furcifera,* Horváth），灰飞

虱（*Laodelphax striatellus,* Fallén）也可以带毒，但不能传毒，褐飞虱（*Nilaparvata lugens,* Sta°l）既不能带毒也不能传毒（Pu *et al*., 2012）。白背飞虱属于半翅目

（*Hemiptera*）飞虱科（*Delphacidae*），广泛分布于东南亚、南亚及太平洋东岸国家。白背飞虱在我国稻区均有分布，南方稻区尤为严重（王毅，2007），是近年来我国水稻作物上发生严重的稻飞虱之一（沈君慧，2003）。白背飞虱可以在水稻、野生稻、玉米、小麦、狗尾草、高梁、稗草、看麦娘等禾本科植物上取食，但水稻最适宜其寄生，在其他植物上的存活时间短，最多只能生存一个世代（全国白背飞虱协作组，1981）。近年来，白背飞虱在我国大面积暴发。2009年云南彝良稻田内的白背飞虱群体数量惊人，导致了当年SRBSDV的暴发流行（翟保平等，2011）。白背飞虱以若虫和成虫在水稻基部吸食为害为主， 同时成虫在水稻植株组织内产卵也能为害，自2001年SRBSDV的发现，白背飞虱又可通过传播病毒间接为害。白背飞虱获毒后，SRBSDV在昆虫体内增殖和扩散，使得白背飞虱终身带毒（曹杨等，2011），因此白背飞虱对水稻生产的危害更加严重。

白背飞虱的生活史包括卵、若虫和成虫三个阶段。其中若虫期分为5龄，最适宜的生存温度为25-30℃（王毅，2007）。成虫有长翅和短翅两种类型，长翅型属于迁飞型，短翅型属于居留型。白背飞虱受温度的影响，在不同地区不同季节世代长短不同，平均一个世代约为35 d。由于白背飞虱迁入期及栽培制度的不同，白背飞虱在一年内繁殖的代数不同，最高可达11代，最低为2代（王毅，2007）。白背飞虱在我国海南、云南南部及广东南部可以部分越冬，其他地区均不能越冬。白背飞虱凭借远距离迁飞习性，每年4-5月份随西南气流从中南半岛迁入华南及西南南部，夏季再随西南或偏南气流向北迁飞，秋季则随东北气流回迁（沈君慧等，2003；沈慧梅，2010），白背飞虱在迁飞的过程中将SRBSDV扩散到不同的稻区。正是由于白背飞虱的迁徙性和病毒传播介体的特性，使得农田病虫害的防治十分困难，因此急需发展有效的防治方法控制白背飞虱的大规模暴发和阻断病毒的传播。

### **1.1.5** **SRBSDV**介体白背飞虱的传毒特性

白背飞虱是SRBSDV的唯一传播介体，两者具有很高的亲和性。当白背飞虱在SRBSDV病株上饲毒2 d后，80%以上的昆虫个体能够带毒。研究表明白背飞虱的最短获毒时间为5-10 min，且不同龄期的昆虫获毒能力不同，低龄若虫比高龄若虫带毒率低，可能与昆虫取食量相关，高龄若虫取食量多，获得的病毒含量高（曹杨等，2012）；25℃条件下，病毒在白背飞虱体内的循回期为3-11 d，获毒期的虫龄越小病毒的循回期越长（曹杨等，2012）；白背飞虱获毒后可终身带毒，但不经卵传毒，其传毒时间最短为5-10 min，最适温度为25℃，高温或低温均影响其传毒能力，白背飞虱的持续传毒时间为6-14 d，多数个体具有间歇

性的传毒特征，单头带毒虫可平均传播48株水稻；白背飞虱若虫的传毒效率比

成虫高，且水稻幼苗期更易感染病毒（Pu *et al*., 2012; Li *et al*., 2012;蒋德春等，

2012)。

### **1.1.6** **SRBSDV**的基因组及蛋白功能研究

SRBSDV的基因组由10条双链RNA（dsRNA）组成，根据电泳迁移速率从慢到快依次命名为S1-S10（图1-3）。周国辉等（2008）对S9和S10片段进行了序列分析，Wang等（2010）完成了广东水稻上分离的SRBSDV的全基因组序列测定，并通过序列比对发现SRBSDV与RBSDV基因组核苷酸和氨基酸序列的同源性高达60%-85%. Yin等（2011）对ft东省玉米上分离到的SRBSDV基因组进行测序，发现其S7-S10的序列与广东水稻上分离的SRBSDV序列同源性高达99%以上，表明SRBSDV也能侵染玉米。

由于SRBSDV是2008年后才被人们熟知和广泛关注的新病毒，因此对其编码蛋白的功能研究甚少。根据SRBSDV与RBSDV同属于斐济病毒属且编码蛋白的高度同源性，可以推测SRBSDV编码6个结构蛋白（P1、P2、P3、P4、P8、P10）和7个非结构蛋白（P5-1、P5-2、P6、P7-1、P7-2、P9-1、P9-2）（Wang *et al*., 2010）。推测结构蛋白P1为病毒RNA依赖的RNA聚合酶，P2为病毒内核的组分，P3为帽子酶，P4为病毒外壳的B刺突蛋白，P8为病毒的核心衣壳蛋白，

P10为病毒主要外层衣壳蛋白(Isogai *et al*., 1998; Zhang *et al*., 2001; Supyani *et al*., 2007; Liu *et al*., 2007;张蔚明等，2011)。

目前已有的研究主要针对SRBSDV编码非结构蛋白的功能。已知S5编码两个非结构蛋白P5-1和P5-2，其中P5-1蛋白能与S6编码的P6蛋白互作，并且P5-1蛋白可以标记在SRBSDV侵染水稻形成的病毒原质中，推测其与病毒原质的形成有关（Li *et al*., 2013）。P5-2蛋白的功能未知。

S6编码一个非结构蛋白P6，卢嫣红等（2011）采用农杆菌介导的方法在本氏烟中明确P6蛋白具有沉默抑制子功能。研究表明P6蛋白作用在沉默的起始和信号传导阶段，能回复由GFP在16C转基因烟草上引起的系统沉默。其抑制功能作用于蛋白，而不是mRNA。此外，P6 蛋白的表达能加重马铃薯X病毒

（*Potato virus X*）产生的症状，进一步表明P6抑制寄主的基因沉默，使病毒大量的复制，从而产生更加严重的病害症状。此外，最新的研究表明P6蛋白可以通过免疫胶体金标记在病毒原质中，推测其与病毒原质的形成有关（Li *et al*., 2013）。

S7编码两个非结构蛋白P7-1和P7-2. SRBSDV编码的P7-1蛋白与RBSDV编码的P7-1蛋白具有78.8%的氨基酸同源性。已知RBSDV编码的P7-1蛋白可以标记在包裹病毒粒体的管状结构上（Isogai *et al*., 1998）。Liu等（2011）研究表明SRBSDV编码的P7-1蛋白可在昆虫细胞Sf9中独立诱导形成伸出细胞膜的直径约为85 nm的小管结构，且通过酵母双杂交证明P7-1蛋白可以自身互作，

表明P7-1具有在非寄主细胞内独立装配形成小管结构的能力。此外，水稻矮缩病毒（*Rice dwarf virus*, RDV）编码的Pns10也可形成包裹病毒粒体的管状结构，且在昆虫体内和培养细胞中起病毒扩散的功能（Wei *et al*., 2006a; Chen *et al*.，

2012）。因此推测SRBSDV编码的P7-1蛋白在寄主内也形成小管结构，可能参与病毒的扩散。P7-2蛋白的功能未知。

S9编码的非结构蛋白P9-1与RBSDV编码的P9-1蛋白有77%的氨基酸序列同源性。已知RBSDV编码的P9-1蛋白是病毒原质（viroplasm）的组分，可以自身互作并在拟南芥原生质体和Sf9细胞中表达形成类似于病毒原质的包含体，该蛋白可以通过疏水区的互作形成二聚体，再由每个二聚体的C端伸向邻近的二聚体并通过疏水区互作形成四聚体（Isogai *et al*., 1998; Zhang *et al*., 2008；

Akita，2012）。Shimizu等（2011）应用RNA干扰（RNA interference, RNAi）的原理获得的表达P9-1基因dsRNA转基因水稻可以有效地抑制病毒的侵染，证明P9-1蛋白确实与病毒的复制有关。因此推测SRBSDV编码的P9-1可能是形成病毒原质基质的组分，与病毒的复制有关。P9-2的功能未知。

S1 (4500 bp)

P1

P1

P1



S1

S2

S3 S4

S5

S6

S7

S8

S9

S1

S2 (3814 bp)

P2

P2

P2

S3 (3618 bp)

P3

P3

P3

S4 (3571 bp)

P4

P4

P4

S5 (3167 bp)

P5-1 P5-2

P5-1 P5-2

P5-1

P5-2

S6 (2651 bp)

P6

P6

P6

S7 (2176 bp)

P7-2

P7-1

P7-2

P7-1

P7-1

P7-2

S8 (1928 bp)

P8

P8

P8

S9 (1900 bp)

P9-2

P9-1

P9-2

P9-1

P9-1

P9-2

S10 (1798 bp) 0

P10

P10

P10

图1-3. SRBSDV的基因组Fig. 1-3. SRBSDV genome

A, a schematic representation of SRBSDV genome; B, dsRNAs separated on SDS-PAGE gel

## **1.2** 水稻齿叶矮缩病毒

### **1.2.1** 水稻齿叶矮缩病毒的致病特征

水稻齿叶矮缩病毒（*Rice ragged stunt virus*, RRSV）侵染的水稻病株症状为植株矮小，高位分蘖，叶尖卷曲，叶缘缺刻呈锯齿状，叶鞘和叶片背面有长条状脉肿，与SRBSDV侵染的水稻病株症状的显著区别是茎秆不生长瘤状突起（谢联辉和林奇英，1980；邵朝刚，2004）

### **1.2.2** 水稻齿叶矮缩病的发生及危害

近年来由RRSV引起的水稻齿叶矮缩病在我国南方稻区再次发生，并与其他水稻病毒病共存。水稻齿叶矮缩病最早于1976年在印度尼西亚发现，随后在东南亚地区如菲律宾、印度、越南等国家也流行发生（Link *et al*., 1978a, 1978b; Ghosh and John, 1980; Morinaka *et al*., 1983）。我国于1978年在福建省首次发现该病害，随后在广东、江西等省也有发生（谢联辉和林奇英，1980；周亮高，1980；张灿东，1980）。该病害在上世纪七八十年代大面积发生，然而在1990-2005 年

间，该病害在东南亚地区均没有流行发生的报道。直至2006年，越南北部大面积暴发水稻齿叶矮缩病（Du *et al*., 2007），同年在福建省沙县也局部暴发。2007年福建省发病面积增加到8万hm2，发病率达50％-70％的田块约130 hm2，特别在福建长汀、上杭、沙县、永定等地造成严重的危害，龙岩市和三明市也有局部发生（吴美爱，2008；郑璐平等，2008）。在2009-2010 年间，伴随着南方水稻

黑条矮缩病在南方稻区13个省份的稻区暴发，本实验室从海南、云南、广西、广东、湖南等省采集的水稻样本中均检测到RRSV病株。由RRSV引发的水稻病害已扩散到我国南方的多个省份，对我国的水稻生产带来了新的危害。

### **1.2.3** **RRSV**介体褐飞虱的传毒特性

RRSV由褐飞虱（*Nilaparvata lugens*）以持久增殖型方式传播。褐飞虱的传毒特性已比较明确，其最短获毒时间为0.5 h，带毒率约为40%；病毒在褐飞虱体内的平均循回期为10d；褐飞虱的最短传毒时间为0.5 h，传毒率高达40%，但不能经卵传播（谢联辉和林奇英，1980）。但目前对于RRSV在介体褐飞虱体内的侵染循回过程还不清楚。

### **1.2.4** **RRSV**的蛋白功能研究

RRSV属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）水稻病毒属（*Oryzavirus*）的代表成员，其病毒粒体呈球状，为双层壳，直径约为65 nm，核心颗粒约50 nm，整个基因组由10条双链RNA（dsRNA, S1-S10）组成，共编码11个蛋白（Kawano *et al*., 1983, 1984），其中至少编码6 种结构蛋白（P1、P2、P3、P4A 、P8B和P9）和3种非结构蛋白（Pns6、Pns7和Pns10）（Hibino, 1996; 郑璐平等, 2008）。目前已明确S6编码的非结构蛋白Pns6具有多种功能，首先Pns6蛋白具有核酸结合能力，可以结合单链或双链RNA，推测其可能参与病毒的复制和组装（Shao *et al.,* 2004）；其次还参与病毒在寄主植物中的运动，此外还具有沉默抑制子功能

（Wu *et al*., 2010a; Wu *et al*., 2010b）；S7编码的非结构蛋白Pns7能在Sf9细胞中单独表达形成伸出细胞膜的纤维丝状结构，推测其与病毒在介体昆虫体内的扩散有关（郭年梅等，2012）；S10编码的非结构蛋白Pns10具有RNA结合蛋白的特征结构域，以及ATPase 的保守序列（Upadhyaya *et al*., 1997; 邵朝纲, 2004），但具体功能还不清楚；S9编码的结构蛋白P9是病毒刺突蛋白，可能参与病毒与

其介体昆虫最初的识别过程（Zhou *et al*., 1999）。

## **1.3** **RNA**病毒的复制机理

自然界大多数侵染动植物的病毒属于RNA 病毒，其中包括双链RNA

（dsRNA）病毒、单链RNA（ssRNA）病毒。ssRNA病毒又分为正链RNA病毒和负链RNA病毒（谢联辉和林奇英，2004）。RNA病毒的基因组均比较小，很少超过30 kb，然而病毒的复制需要基因组编码的多数蛋白参与，其中病毒编码的依赖于RNA的RNA聚合酶蛋白（RdRp）是病毒RNA复制所必需的。由于病毒种类和核苷酸序列的多样性，不同病毒的复制过程存在差别，然而病毒的复制还是遵循着一些普遍的复制机理（Tao and Ye, 2010）。

### **1.3.1** **ssRNA**病毒的复制

正链RNA病毒的复制发生在寄主细胞的细胞质中，并且与细胞质膜有关。正链RNA病毒首先侵入寄主细胞，建立细胞质内的复制工厂，在RNA复制复合体的作用下复制基因组RNA，表达蛋白，经过组装后的病毒粒体释放到细胞内（Denison, 2008）。RNA复制复合体由病毒编码的RdRp、解旋酶、加帽酶、

NTPase等蛋白参与形成，此外寄主细胞的蛋白在病毒的复制过程中通常也起着重要的作用。寄主细胞的膜状结构在正链RNA病毒的复制中同样起着重要的作用，正链RNA病毒侵染寄主细胞后，寄主的细胞内膜结构发生重排形成病毒复制复合体的锚定位点（Salonen *et al*., 2005），复制复合体利用非结构蛋白的疏水性序列可与细胞内膜结构发生膜融合或互作的特性结合在内膜结构上。正链

RNA病毒诱导形成的膜状结构通常来源于不同的细胞器，包括内质网、溶酶体、线粒体外膜等，如兽棚病毒（*Flock house virus*）诱导的50 nm囊泡结构由线粒体外膜内陷形成（Kopek, 2007）；痘病毒（*Poxvirus*）通过内质网的出芽形式形成1-2 μm 的胞质体（Schramm and Locker, 2005）；小核糖体核酸病毒

（*Picornavirus*）的病毒RNA复制发生在来源于内质网的双层膜囊泡的细胞质表面（Egger *et al*., 2000）。这些病毒诱导的膜状结构保护病毒复制复合体合成病毒

RNA，促进病毒复制所需组分的聚集，提供附着复制复合体的平台，在细胞质内隔离病毒的复制过程，阻碍寄主细胞对病毒复制的防御反应（Kopek, 2007）。负链RNA病毒分为不分节段单股负链RNA病毒和分节段负链RNA病毒，

病毒在寄主细胞质中进行复制。负链RNA病毒复制和转录的唯一模板是一个由螺旋状蛋白包裹的基因组核酸，其与聚合酶蛋白结合后形成核糖核蛋白复合体

（RNP）。负链RNA病毒侵入寄主细胞后，通过膜融合将RNP释放到细胞质中，然后开始转录、复制。病毒以基因组RNA转录出mRNA，用于翻译合成病毒蛋白，同时又作为模板转录形成基因组RNA（Tao and Ye, 2010;曾江勇等, 2006）。

### **1.3.2** **dsRNA**病毒的复制

dsRNA病毒包含8个科的病毒，其基因组由1-12条dsRNA组成，含有双层衣壳。dsRNA病毒的复制发生在亚病毒粒体（Subviral particles），亚病毒粒体又叫做核心粒体（Core），由病毒衣壳、病毒基因组与RdRp组成（Tao and Ye,

2010）。dsRNA病毒侵入寄主细胞后，病毒粒体脱去外层衣壳蛋白，剩下核心粒体，在核心粒体中病毒的基因组片段由与核心粒体相连的RNA聚合酶转录产生

mRNA，然后从核心粒体中释放出来。产生的mRNA一方面用于表达病毒蛋白，另一方面用于生成病毒的基因组dsRNA（Wei *et al*., 2006b）。目前已明确dsRNA病毒的复制和装配发生在由病毒蛋白形成的颗粒状分散的内含体中，这些内含体分布在寄主细胞的细胞质中。在呼肠孤病毒和轮状病毒中这些内含体通常被称为病毒工厂（Viral factories）、病毒原质（Viroplasm），或病毒内含体（Viral inclusion bodies）（Fields *et al*., 1971; Parker *et al*., 2002; Broering *et al*., 2005; Thomas *et al*., 1990; Brookes *et al*., 1993）。在病毒原质中内层衣壳蛋白聚集形成核心粒体，随后mRNA被分拣和包装到核心粒体并转录形成dsRNA，最后外层衣壳蛋白包裹核心粒体形成成熟的病毒粒体。

### **1.3.3** 呼肠孤病毒复制场所的研究

呼肠孤病毒科的病毒属于dsRNA病毒，基因组由10-12条dsRNA组成，含有双层衣壳，无囊膜包裹（Attoui *et al*., 2012）。呼肠孤病毒在侵染细胞中形成特定的病毒复制场所——病毒原质或病毒工厂。病毒原质由病毒编码的蛋白参与形成，不同病毒参与形成病毒原质的蛋白组分不同。RDV的非结构蛋白Pns6、Pns11和Pns12参与了病毒原质的形成，三者均可形成类似于病毒原质的结构，而且

Pns6具有RNA结合活性（Wei *et al*., 2006b）；水稻瘤矮病毒（*Rice gall dwarf virus,*

RGDV）的非结构蛋白Pns7、Pns9和Pns12参与了病毒原质的形成（Akita *et al*.,

2011）；RBSDV的P9-1蛋白也可在Sf9细胞中形成类似于病毒原质的结构，是形成病毒原质的组分（Akita *et al*., 2012）。此外哺乳动物呼肠孤病毒（*Mammalian*

*reovirus*）的μNS蛋白、轮状病毒（*Rotavirus*）的NS5蛋白、BTV的NS2蛋白均是形成病毒复制场所的蛋白（Broering *et al*., 2002; Eichwald et al., 2004; Poncet *et al*., 1997; Brookes *et al*., 1993; Modrof *et al*., 2005）。这类蛋白具有一些共有的特性，如属于非结构蛋白、能形成类似于病毒内含体的结构、能与核心蛋白共定位、以及具有RNA结合活性等。

## **1.4** 植物病毒在介体昆虫体内的扩散机理

目前已知的植物病毒中约76%需要介体传播，其中55%的病毒是通过同翅目昆虫传播的，这些昆虫主要包括飞虱、粉虱、蚜虫、叶蝉等（[Hogenhout](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Hogenhout%20SA%22%5BAuthor%5D) *et al*.，

2008）。根据介体昆虫对病毒的获毒时间和传毒时间的长短，可将介体昆虫传播的植物病毒分为非持久传播型病毒（Nonpersistent transmission virus）和持久传

播型病毒（Persistent transmission virus），介于这两种类型之间还有一种半持久传播型病毒（Semipersistent transmission virus）。持久传播型病毒又可分为持久非增殖型病毒（Persistent nonpropagative virus）和持久增殖型病毒（Persistent propagative virus）（Nault, 1997; Ng and Falk, 2006）。不同类型病毒的传播特性如表1-2所示。

表1-2 昆虫传播植物病毒的传播类型

Table 1-2. Transmission manners of viruses infecting plant by insect vectors（Ng et al., 2006）

|  |  | 传播类型（Transmission manner） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 传播特性  Transmission characteristic | 非持久型  Nonpersistent | 半持久型  Semipersistent | 持久非增殖型  Persistent- nonpropagative | 持久增殖型  Persistent-propagative |
| 获毒时间（Acquisition time） | 几秒内 | 几分钟内 | 几小时内 | 几小时内 |
| 滞留时间（Retention time） | 几分钟至  几小时 | 几小时至  几天 | 获毒后终身带毒 | 获毒后终身带毒 |
| 病毒到达唾液腺  (Virus in salivary gland) | 无 | 无 | 有 | 有 |
| 潜伏期（Latent period） | 无 | 无 | 几小时 | 几天至几周 |
| 复制（Replication） | 不 | 不 | 不 | 有 |
| 卵传（Transovarial） | 不 | 不 | 不 | 部分病毒 |

### **1.4.1** 病毒在介体内的侵染屏障

半翅目昆虫的刺吸式口器不仅能有效地吸取植物汁液，而且是携带和传播非持久型病毒和半持久型病毒的位点。非持久型病毒和半持久型病毒在介体内主要滞留在介体昆虫的口针或前肠，病毒需要突破口针或前肠受体识别屏障才能被介体携带并传播，如莴苣侵染性黄花病毒（*Lettuce infectious yellows virus*）滞留在介体蚜虫的前肠，其编码的外壳蛋白组分CPm 参与病毒在前肠的滞留和传播

(Nault and Ammar, 1989; Powell *et al*., 2006; Chen *et al*., 2011b)。

持久传播型病毒在昆虫体内需要从口针进入中肠，最后扩散到唾液腺才能被介体传播。同翅目昆虫的中肠在组织上从内到外分别为肠腔、上皮细胞层、基底膜、环肌、纵肌和围膜（彩万志等，2002）。病毒侵染过程中必然面临着重重屏障，如中肠侵入屏障、中肠释放屏障、唾液腺侵入屏障、唾液腺释放屏障和经卵传播屏障等（Ammar, 1994; Ammar and Nault, 2002; Ammar and Hogenhout,

2008）。正是由于多种屏障的存在，才导致不同的病毒只能被特定的介体昆虫有效传播，而无法被非介体昆虫带毒或传毒。

病毒在侵入中肠过程中，面临着由中肠上皮细胞的微绒毛以及中肠表面的受体蛋白组成的中肠侵入屏障。如缨翅目蓟马的中肠上皮细胞在不同发育阶段发生部分重建，中肠的发育导致二龄蓟马若虫可以携带并传播TSWV，而成虫则无法携带并毒（Nagata *et al*., 1999）；此外，通过胸腔注射将玉米花叶病毒（*Maize mosaic virus*, MMV）注射到叶蝉体内能导致叶蝉的带毒率显著高于在病株上直接取食后的带毒率（Falk and Tsai, 1985; Ammar *et al*., 2005），间接证明了植物病毒在介体

内面临着中肠侵入屏障。

病毒从中肠上皮细胞向中肠外扩散的过程中面临着由基底膜构成的中肠释放屏障。TSWV在西花蓟马（*Frankliniella occidentalis*）体内可以成功突破基底膜屏障从中肠上皮细胞扩散到中肠表面的肌肉，而在棉蓟马（*Thrips tabaci*）体内病毒可能受基底膜屏障的阻碍几乎不能到达中肠表面的肌肉（Nagata *et al*.，

2002）。除了中肠基底膜的物理屏障，中肠作为获毒和传毒重要屏障的其他原因可能是中肠肠腔消化酶对病毒的灭活、中肠上缺乏病毒的受体蛋白、病毒无法在中肠中复制或病毒遭遇介体强烈的抗病毒防御反应。

昆虫的唾液腺侵入和释放屏障直接关系着介体是否可以传播病毒。唾液腺组织的结构、生理和化学特性都可能是产生唾液腺侵入或释放屏障的因素（Nault and Rodriguez, 1985; Ammar and Hogenhout, 2008; Ammar and Nault, 2002）。病毒在唾液腺中复制后必须突破唾液腺释放屏障才能释放到唾液腺细胞外的唾液中，病毒在唾液腺中的数量少或在唾液腺中被灭活也可能是唾液腺的释放屏障。如番茄黄曲叶病毒（*Tomato yellow leaf curl sardinia virus*）CP突变体株系的病毒粒体不稳定，导致病毒虽然可以侵染介体蚜虫的唾液腺，但无法突破唾液腺释放屏障而被有效地传播（Caciagli *et al.,* 2009）。

### **1.4.2** 植物病毒的侵染循回过程

#### **1.4.2.1** 非持久型和半持久型植物病毒的侵染循回过程

非持久传播型病毒是指介体昆虫可在取食的瞬间获毒，并在几分钟内完成传毒，病毒在昆虫体内不需要潜伏期，且传毒后或蜕皮后昆虫即失去带毒能力。这类病毒的传播介体主要是蚜虫，蚜虫在病株上取食后，病毒通常滞留在昆虫的口针内。蚜虫在飞行过程中不能直接辨别出适合取食和繁殖的寄主植物，需要不断地落到植物上并通过口针刺探才能识别出合适的寄主植物，在刺探或取食的过程中病毒即从口针传播到寄主植物中（Nault, 1997; Powell *et al*., 2006）。

半持久传播型病毒在昆虫体内也不需要潜伏期，昆虫可以在几分钟内获毒，但需要几个小时的传毒时间。这类病毒的传播介体有蚜虫、粉虱和叶蝉，病毒主要滞留在介体昆虫的前肠，但也有例外，如花椰菜花叶病毒（*Cauliflower mosaic virus*, CaMV）主要滞留在昆虫的口针（Uzest *et al*., 2007）。半持久型病毒对获毒时间和传毒时间均较非持久型病毒的长，可能的原因是大多数半持久型病毒被限制分布于韧皮部，而非持久型病毒多数为非组织特异性分布。因此，如果半持久型病毒侵染的寄主植物同时也是介体昆虫的最适取食寄主，则非常有利于病毒的获取和传播。非持久型病毒和半持久型病毒的共同点是病毒不需要经过唾液腺组织，且介体昆虫不能将人工注射到血淋巴的病毒传播到健康植物（Ng *et al*., 2006）。

#### **1.4.2.2** 持久非增殖型植物病毒的侵染循回过程

黄症病毒科（*Luteoviridae*）、双生病毒科（*Geminiviridae*）和矮化病毒科

（*Nanoviridae*）的病毒属于持久非增殖型病毒，主要由蚜虫、粉虱等传播

（Hogenhout *et al.,* 2008）。持久非增殖型病毒在昆虫体内不复制，但需要在体内循回扩散到唾液腺才能被传播到新的寄主植物。昆虫取食病株后，病毒首先进入昆虫的肠腔，随后横穿中肠或者后肠的上皮细胞到达血淋巴，然后通过血淋巴进入唾液腺，再次取食时病毒随唾液释放到新的寄主。黄症病毒可通过内吞作用进入肠道上皮细胞，然后又快速地通过胞外分泌的方式从上皮细胞进入血淋巴，同样通过内吞作用进入唾液腺并通过胞外分泌方式从唾液腺释放（Garret *et al*., 1993; Gray and Gildow, 2003）。病毒粒体在介体内扩散的速度非常快，例如蚜虫取食马铃薯卷叶病毒（*Potato leafrool virus*）4 h后病毒到达蚜虫中肠上皮细胞，8 h后病毒即扩散到血淋巴，而且当蚜虫在病株上取食时昆虫上皮细胞内的病毒不断增多，一旦蚜虫离开病株，中肠上皮细胞内的病毒即开始快速下降（Garret *et al*., 1996）。双生病毒科的玉米条纹病毒（*Maize streak virus*, MSV）主要分布于滤室和中肠的上皮细胞，介体叶蝉饲毒3d后可以持续传毒35d（Lett *et al*., 2002; Reynaud and Peterschmitt, 1992）。

#### **1.4.2.3** 持久增殖型植物病毒的侵染循回过程

持久传播型病毒是指昆虫可以在几小时内获毒，病毒侵入昆虫体内后需要一个较长的潜伏期才能侵染新的寄主，且昆虫一经带毒则终身带毒，即使昆虫蜕皮之后病毒仍然滞留在介体体内（Hogenhout *et al.*, 2008）。持久增殖型病毒的初侵染病毒很少，侵染后的病毒必须在体内大量复制增殖，且有些病毒还可经卵将病毒传递给下一代，如RDV和水稻条纹病毒（*Rice stripe virus*, RSV）（谢联辉等，1982, 1991）。

持久增殖型的植物病毒主要由蓟马、飞虱和叶蝉传播。番茄斑萎病毒属

（*Tospovirus*）的番茄斑萎病毒（*Tomato spotted wilt virus*, TSWV）由蓟马以持久增殖型方式传播（Ohnishi *et al*., 2001）。蓟马取食病株后，病毒粒体通过前肠的肠腔到达中肠，中肠肠腔内由中肠微绒毛的刷状缘伸入肠腔形成病毒的第一道侵染屏障，病毒粒体与中肠粘附并穿过微绒毛进入中肠上皮细胞建立初侵染点。病毒在上皮细胞内进行复制后横穿基底膜屏障释放到中肠表面的肌肉组织，再从肌肉扩散到唾液腺。TSWV必须穿过唾液腺基底膜才能侵入唾液腺，病毒在唾液腺内进行复制，并在蓟马取食时随唾液从唾液腺腔体经过口针进入健康植物寄主

(Assis Filho *et al*., 2002; Nagata *et al*., 2002)。

目前已知飞虱传播的18种病毒均为持久增殖型病毒（Hogenhout *et al*., 2008），如灰飞虱传播的RSV和RBSDV、褐飞虱传播的RRSV和水稻草状矮缩病毒（*Rice grassy stunt virus*）、白背飞虱传播的SRBSDV等（谢联辉和林奇英，1980；林奇英等，1991，1993；陈佳等，2008；周国辉等，2008）。RRSV 的病

毒粒体在褐飞虱取食的过程中随水稻汁液进入中肠肠腔，但仅有少量的病毒可以侵入中肠上皮细胞建立初侵染点，病毒在上皮细胞内复制后直接穿过基底膜到达中肠表面并进行复制，病毒在中肠表面沿着环肌和纵肌扩散到其他器官，同时病毒通过血淋巴扩散到唾液腺，完成病毒在昆虫体内的侵染循回过程（Jia *et al*.，

2012c）。此外，由黑尾叶蝉传播的RDV和电光叶蝉传播的RGDV也属于持久增殖型传播的病毒（谢联辉等, 1982; Hibi *et al*., 1984）。RDV的病毒粒体首先从口针通过食道到达叶蝉的滤室建立初侵染点，病毒在滤室上皮细胞复制后向邻近的器官扩散，如前中肠、后肠、马氏管和食道等，饲毒后12d，病毒到达唾液腺以及卵巢管的卵泡细胞，从而完成病毒在昆虫体内的侵染循回过程（Chen *et al*., 2011a）。

持久增殖型病毒在介体体内的循回过程通常是在昆虫取食病株后，病毒随汁液进入昆虫的肠腔，随后进入中肠或后肠的上皮细胞并进行复制，然后扩散到其他器官或血淋巴，最后扩散到唾液腺并进行复制，当昆虫再次取食时，病毒随唾液传到健康植物寄主（Ng *et al*., 2006）。但不同的病毒在介体内的侵染循回过程又有所不同，因此，我们有必要针对SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回过程进行研究，以阐明白背飞虱高效传播SRBSDV的机理。

### **1.4.3** 病毒突破侵染屏障的途径

持久型病毒必须侵染介体的消化道，并从消化道扩散到唾液腺才能被介体传播。病毒从中肠扩散到唾液腺需突破中肠释放和唾液腺侵入屏障。通常病毒可从中肠扩散到血淋巴，并通过血淋巴扩散到唾液腺和其他组织（Falk and Tsai, 1985; Ammar *et al*., 2005; Ammar *et al*., 2009）。有关动物和植物病毒的研究表明病毒还可能通过神经、气管或肌肉组织从中肠扩散到唾液腺（Gomes-Leal *et al*., 2006）。玉米细条纹病毒（*Maize fine streak virus*）在介体内2周后侵染血淋巴和神经组织，

3周后侵染器官，4周后扩散到唾液腺，推测病毒可能通过神经和器官扩散到唾液腺（Todd et al., 2010）。Ammar和Hogenhout对MMV的研究首次发现病毒首先从前中肠扩散到食道和前憩室，然后借助神经系统扩散到唾液腺，从而突破中肠释放和唾液腺侵入屏障（Ammar and Hogenhout, 2008）。RDV侵染介体黑尾叶蝉4 d后即可到达中中肠表面的神经，6d后在与唾液腺相连的神经丝上也有病毒分布，推测RDV可以通过神经系统扩散到唾液腺（Chen *et al*., 2011a）。双翅目和半翅目昆虫的中肠由大量的肌肉包裹，同时也与气管系统紧密相连，前肠和前中肠的肌肉运动主要受口部的神经系统调控（Chapman, 2003），因此病毒可借助气管系统和中肠表面的肌肉系统进行扩散。如蚊子传播的委内瑞拉马脑炎病毒

（*Venezuelan equine encephalitis virus*）能利用气管和中肠表面的肌肉突破中肠的基底膜（Romoser *et al*., 2004）；黑尾叶蝉传播的RDV可以借助Pns10小管结构在中肠表面的肌肉组织快速扩散（Chen *et al*., 2012）；蓟马传播的TSWV可以侵

染中肠和前肠的肌肉，并且通过连接唾液腺和中肠的韧带将病毒快速地从中肠扩散到唾液腺（de Assis Filho *et al*., 2002）。此外，气管系统是昆虫病毒如苜蓿银纹夜蛾M核型多角体病毒（*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*,

AcMNPV）在粉纹夜蛾若虫体内扩散的主要途径（Engelhard *et al*., 1994）。

### **1.4.4** 病毒编码蛋白介导病毒的扩散

植物病毒在寄主植物内的扩散需要运动蛋白的参与，如RSV编码的Nsvc4

蛋白参与病毒在植物体内的胞间扩散（Xiong *et al*., 2008; Zhang *et al*; 2012）；

RRSV编码的Pns6蛋白具有运动蛋白的功能，可以促进烟草花叶病毒（*Tobacco mosaic virus*）在珊西烟中的胞间扩散（Wu *et al.,* 2011b）。同样，植物病毒在介体昆虫体内的扩散也需要特定的病毒蛋白参与。

非持久型和半持久型病毒编码的蛋白参与病毒与介体的专化性识别过程，通过病毒蛋白与介体受体蛋白的互作使病毒滞留在介体的口针或前肠，在介体昆虫取食过程中，病毒被传播到健康的寄主植物（Nault and Ammar, 1989; Nault, 1997; Powell *et al*., 2006）。非持久型病毒与介体的互作存在外壳蛋白和辅助蛋白两种策略。外壳蛋白策略即病毒的外壳蛋白（coat protein, CP）与介体的受体蛋白互作，该互作有利于介体携带病毒。如黄瓜花叶病毒（*Cucumber mosaic virus*）通过CP与蚜虫口针上的受体蛋白互作，从而使病毒粒体附着在口针上（Ng and perry，

2004）。辅助蛋白策略即病毒编码的非结构蛋白作为辅助蛋白（Helper component proteinase, HC-Pro）与病毒外壳蛋白及介体的受体蛋白同时互作，帮助介体携带病毒。如洋李痘疱病毒（*Plum pox virus*）和烟草蚀纹病毒（*Tobacco etch virus*）编码的HC-Pro蛋白与蚜虫的传毒有关，HC-Pro蛋白具有与病毒外壳蛋白互作的

PTK结构域以及与蚜虫口针受体蛋白互作的KITC结构域，从而帮助病毒粒体附着在口针上（Froissart *et al*., 2002; Plisson *et al*., 2003; Ballut *et al*., 2005; Ruiz-Ferrer *et al*., 2005; Goytia *et al*., 2006; Young *et al*., 2007）。半持久型病毒的传播也需要采用辅助蛋白的策略，但需要由多个蛋白参与形成的辅助蛋白复合体来完成。如CaMV通过多个蛋白间的互作建立桥梁将病毒粒体附着在蚜虫的口针

(Palacios *et al*., 2002; Drucker *et al*., 2002; Uzest *et al*., 2007)。

持久非增殖型病毒也需要病毒蛋白与介体蛋白的专化性识别，一方面帮助病毒粒体侵入昆虫细胞，另一方面帮助病毒突破介体内的各种侵染屏障并在介体体内的组织或器官间扩散。Brault等（1995, 2000, 2003, 2007）通过对甜菜西方黄化病毒（*Beet western yellows virus*）在介体蚜虫体内侵染的研究，明确病毒编码的通读蛋白（readthrough domain）和CP分别与寄主的捕捉受体（capture receptors）和内吞受体（endocytic receptors）识别，从而引发内吞作用将病毒粒体转运到中肠细胞内。

持久增殖型病毒也需要病毒和介体因子的参与进行扩散和传播。研究表明

RDV的外壳蛋白P2分布于病毒粒体的外层衣壳表面，参与病毒在介体内的侵染

（Zhou *et al*., 2007）。RDV的外层衣壳非常不稳定，外层衣壳在病毒通过内吞作用进入细胞时脱落，侵染前脱落外层衣壳的病毒粒体不能侵染培养细胞或被介体叶蝉获毒；经四氯化碳处理脱掉P2蛋白的病毒粒体也不能侵染培养细胞或被介体叶蝉获毒，即使将丢失P2蛋白的病毒粒子注射到昆虫血腔也不能有效传播，仅有完整的病毒粒体可以侵入叶蝉细胞并复制（Tomura *et al*., 1997; Omura *et al*., 1998; Yan *et al*., 1996），因此RDV的P2蛋白在病毒的侵入过程中起着至关重要的作用。RDV在昆虫细胞或体内复制后，需要从侵染细胞扩散到其他组织或器官。Nasu早在1965年就在RDV侵染的叶蝉中肠微绒毛内观察到包裹病毒粒体的管状结构（Nasu, 1965），Wei等（2006a）证明RDV编码的Pns10即形成管状结构的蛋白，通过免疫电镜也确认穿过微绒毛以及分布在中肠表面肌肉组织的管状结构即Pns10蛋白。Pns10可形成包裹病毒粒体的管状结构通过丝状伪足伸向临近的细胞，进行病毒的胞间扩散。上述研究证明RDV可通过由Pns10形成的小管结构帮助病毒在细胞间和组织间扩散（Chen *et al*., 2012）。此类管状结构的蛋白在水稻黑条矮缩病毒侵染的灰飞虱体内也存在（Isogai *et al*., 1998），可能是植物呼肠孤病毒所特有的蛋白结构。此外，TSWV 编码两个膜糖蛋白GN 和

GC，参与病毒与蓟马中肠的互作以及病毒粒体与细胞膜的融合过程（Whitfield *et al*., 2004, 2005, 2008）；棒状病毒（*Rhabdovirus*）表面的G蛋白参与病毒侵入寄主细胞的过程并促进病毒的胞间扩散（Pulmanausahakul *et al*., 2008）。

以上研究结果表明植物病毒编码蛋白与介体昆虫因子的互作直接关系到病毒能否侵染介体昆虫并被昆虫有效地传播。研究病毒与介体因子的互作将从分子水平深入解析病毒在介体内的侵染循回机理。

## **1.5** **RNAi**原理及其应用

### **1.5.1** **RNAi**现象的发现

Napoli等（1990）为了使矮牵牛的花更加鲜艳，将查尔酮合成酶基因（CHS）转入矮牵牛植株，结果发现花色不但没有更加鲜艳，反而变成白色，表明转入的基因不但没有表达，反而使植物中原有的基因也被抑制，成为首例发现的基因沉默现象。随后Guo和Kemphues（1995）在线虫中也发现基因沉默现象。Fire 等

（1998）首次证实Guo 等在线虫中发现的基因沉默现象是由dsRNA 引发的

mRNA降解，并首次命名该现象为RNA干扰（RNA interference, RNAi）。RNAi

是指dsRNA介导细胞内mRNA特异性降解，并使目的基因转录后沉默的现象。

### **1.5.2** **RNAi**的作用机理

RNAi在真核生物细胞的基因表达调控中起着重要的作用。通过RNAi途径可以调控细胞的新陈代谢、生长和分化，维持基因组的完整性，以及抵抗病毒的

侵入等（Jinek and Doudna, 2009）。已知人体内至少30%的基因由RNAi途径进行调控（Lewis *et al*., 2005）。RNAi通常由dsRNA诱导产生，细胞内的dsRNA被III型的RNA酶识别并切割成20-30 nt的双链小RNA片段，这种III型的RNA酶被命名为Dicer（Bernstein *et a1*., 2001）；产生的双链小RNA片段解链后，其中的一条链被含有AGO（Argonaute）蛋白的蛋白复合体识别并进行修饰；修饰后的小RNA再与蛋白复合体形成核酸蛋白复合体，即RNA诱导的基因沉默复合体（RNA Induced Silencing Complex, RISC）( Hammond *et a1*., 2000)；RISC在小RNA的引导下，识别靶标基因序列，对靶标基因从转录、转录后、翻译水平进行基因表达调控，从而完成整个RNAi过程。在RNAi途径中起关键作用的蛋白家族有Dicer蛋白家族和AGO蛋白家族，以及RNA依赖的RNA聚合酶

（RNA-dependent RNA polymerases, RdRp）。Dicer 在RNAi 的起始阶段识别

dsRNA并切割成siRNA；由AGO蛋白参与形成的蛋白复合体对siRNA进行修饰后引导单链siRNA与靶标基因的mRNA结合，并将mRNA切割，实现RNAi的效应阶段；RdRp起着RNAi信号的放大作用，起作用是以细胞内产生的siRNA为引物，以mRNA为模板进行复制产生大量的dsRNA供Dicer切割，从而生成更多的siRNA使siRNA的量达到发生RNAi所需的阀值（Hall *et al*., 2002; Volpe *et al*. 2002,）。RdRp并不是在所有真核生物的RNAi途径中都需要，目前在植物、真菌和线虫中发现有RdRp的存在，而在果蝇和哺乳动物中未发现（Schwarz *et al*., 2002; Roignant *et al*., 2003）。

细胞内由dsRNA产生的小RNA片段有3种类型，分别为小干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)、microRNA（miRNA）和与PIWI互作的RNA（piRNA）。其中siRNA的前体包括病毒复制形成的双链RNA中间体、转座子序列及反相重复序列，这些dsRNA经Dicer切割后形成21-25nt的siRNA. miRNA则来源于真核生物基因组特异编码的dsRNA，产生的miRNA具有高度的保守性，通常调控真核生物的生长发育、胁迫应答和信号转导等过程（Carrington and Ambros, 2003; Bartel, 2004）。piRNA是一类24-31nt的小RNA，主要降解动物胚胎细胞中的转座子基因，该类小RNA的前体不是dsRNA，且不需要Dicer的切割，而是通过Dicer另一分支蛋白PIWI的切割产生（Jinek and Doudna, 2009）。

### **1.5.3** **RNAi**技术的应用

随着分子生物学的迅猛发展，真核生物本身所具有的RNAi途径逐渐被认识，并发展成为RNAi技术，即利用外源的dsRNA介导靶基因mRNA特异性地降解，使目的基因转录后沉默，引起基因功能缺失（Fire *et al*., 1998; Hannon, 2002）。Fire等（1998）将外源dsRNA注入线虫体内，诱发了显著的基因沉默现象，从而实现了RNAi技术的首次成功应用。随后RNAi技术在细胞水平和昆虫个体水平得到了广泛的应用，主要用于研究昆虫基因功能，病毒基因功能和病虫

害的防治等。

RNAi 技术在细胞水平用于病毒基因功能的研究。体外合成的siRNA 在

MA104细胞中干扰轮状病毒（*Rotavirus*）NSP4蛋白的表达，能够抑制病毒原质的成熟、引起病毒原质中各组分蛋白的分布不均和抑制病毒粒体的组装（Slivertri *et al*., 2005）。通过siRNA诱导的RNAi在293T细胞中干扰哺乳动物呼肠孤病毒

μ2、μNS和σNS蛋白的表达，明确了μ2、μNS和σNS均是病毒复制的必要组分

(Kobayashi *et al*., 2006)。

由外源dsRNA诱导的RNAi技术为病虫害的防治注入了新的生机。近年来通过摄取dsRNA诱导的RNAi技术被大量的研究证明是一种新的可行的农业病虫害防治手段。例如：将棉铃虫参与棉毒素解毒的P450基因转入棉花可以降低棉铃虫对棉酚的耐性，从而使棉铃虫生长缓慢，甚至死亡（Mao *et al*., 2007）；将源自黄曲条跳甲嗅觉感应器Or基因的dsRNA注射到黄曲条跳甲蛹内，可以削弱黄曲条跳甲对寄主植物的取食倾向性（Zhao *et al.,* 2010）；通过膜饲喂法饲喂源自褐飞虱海藻糖磷酸化合成酶基因（TPS）的dsRNA可作为褐飞虱防治的有效手段（Liu *et al*., 2010; Chen *et al*., 2010）；Shimizu等（2011）通过转基因水稻表达RSV的pC3和pC4基因的dsRNA片段可以高效抵御病毒的侵染。此外，RNAi技术在昆虫体内可用于研究病毒蛋白的功能，通过饲喂源于RDV Pns10基因的

dsRNA可以抑制RDV在叶蝉消化道器官的扩散，从而明确Pns10蛋白参与RDV在昆虫体内的扩散（Chen *et al*., 2012）。RNAi 技术已成为一种有效的工具，不仅可应用于病虫害的防治，还可以用于病毒基因功能的研究。因此本研究将首先通过体外合成的源自白背飞虱Actin基因的dsRNA探索适合于白背飞虱的RNA干扰体系，然后将RNAi技术应用于研究SRBSDV编码蛋白的功能，为防治白背飞虱的发生和病毒病的流行奠定基础。

## **1.6** 昆虫培养细胞的应用

### **1.6.1** 昆虫培养细胞概况

随着生命科学的迅猛发展，以昆虫细胞为培养对象的昆虫细胞培养技术愈来愈受到重视，越来越多地被应用于分子生物学、细胞生物学、昆虫学、病毒学、遗传学和医药学等研究领域。昆虫细胞培养最早开始于1915年，经过多代人的不断探索和改进，Grace（1962）首次建立了桉蚕蛾（*Antheraea eucalypti Scott*）卵巢的可持续细胞系。此后，昆虫细胞培养工作在世界范围内广泛开展，到目前为止已建立了约800种来自不同昆虫不同组织的昆虫细胞系（张寰等，2007）。

其中源于双翅目和鳞翅目的昆虫细胞系均占40%以上，而同翅目昆虫细胞系仅占约4%（张寰等，2007）。根据科学研究的需要，昆虫细胞系的组织来源也多种多样，目前已建立的昆虫细胞系主要来源于昆虫的卵巢、精巢、脂肪体、成虫盘、

胚胎、中肠、唾液腺、血淋巴、神经系统和肌肉等（张寰等，2007）。随着科学研究的高速发展，更多的昆虫细胞系将源源不断的出现以满足科学发展的需求。

### **1.6.2** 昆虫培养细胞的应用

经过几十年的发展，昆虫培养细胞已成为生物学研究的必备材料和常规研究手段，这一技术被广泛地应用于分子生物学、细胞生物学、昆虫学、病毒学、遗传学和医药学等研究领域。

首先，昆虫培养细胞可用于表达外源基因。目前全世界已建立了约800种的细胞系，但应用最为广泛的是由Vaughn等（1977）建立的草地贪夜蛾细胞系Sf21及其克隆株Sf9. Smith和Summers（1983）首次建立了昆虫细胞—杆状病毒表达系统（Baculovirus expression vector system），成功地将人的β-干扰素通过重组的AcMNPV在草地贪夜蛾细胞系Sf9中表达。此后，基于昆虫培养细胞的杆状病毒表达系统受到国内外科学家的广泛应用。由于昆虫细胞杆状表达系统具有安全性高，表达能力强，插入片段容量大，且能对表达的蛋白进行完备的翻译后加工和修饰等特点，已成为基因工程的四大表达系统之一。目前昆虫细胞杆状病毒表达系统已用于功能基因组学的研究，为研究蛋白的结构与功能，以及蛋白之间的互作关系提供了便利的蛋白表达技术。同时，由于昆虫细胞杆状病毒表达系统能表达具有生物活性的生物大分子，使其在疫苗和药物的开发和生产中发挥着越来越重要的作用。例如通过家蚕杆状病毒表达载体系统生产乙肝抗原（Mathur *et al*., 1996; Tonjes, 1997）。此外，由于杆状病毒对人畜无害，稳定性好，专一性强，且不易引起害虫的抗性，是田间虫害的最佳生物杀虫剂，因此可以通过昆虫培养细胞繁殖重组杆状病毒，用于大量制备生物杀虫剂（Inceoglu *et al*., 2001）。

其次，昆虫培养细胞可用于研究病毒的侵染特性和蛋白功能。在上世纪六十年代，Peleg和Singh建立了多个蚊子细胞系，随后Igarashi（1978）从Singh的埃及伊蚊若虫系中筛选出一个适于登革热病毒（*Dengue virus*）生长的细胞系

C6/36。此后，C6/36细胞系成为研究人和动物病毒通常使用的工具，被用于研究登革病毒（*Dengue virus*）、日本脑炎病毒（*Japanese encephalitis virus*）、辛德毕斯病毒（*Sindbis virus*）和西方尼罗河病毒（*West nile viru*）等的侵染机理，以

及研究病毒编码蛋白的功能和参与病毒侵染过程的介体昆虫因子（Olson *et al*., 1992; Boonsanay and Smith, 2007; Chu *et al*., 2006; Adelman *et al*., 2002; Salas-Benito and Angel, 1997; Muñoz *et al*., 1998; Salas-Benito *et al*., 2007）。

Bernard等（1994）构建了果蝇细胞系S2并被广泛使用，目前S2细胞系可用于

鉴定病毒沉默抑制子、表达病毒蛋白、悬浮培养制备单克隆抗体等（van Cleef *et al*., 2011; Astray *et al*., 2013; Wang *et al*., 2012），还可以用于研究介体昆虫体内的抗病毒RNA干扰机制（Mukherjee and Hanley, 2010）。

此外，昆虫培养细胞可用于昆虫自身基因和生理特性的研究。果蝇是遗传学

和基因组学研究的模式生物体，目前已获得了果蝇的全基因组序列，一个稳定的可诱导表达的果蝇细胞系将有利于对大量基因的功能分析。而果蝇S2细胞系提供了一个最佳的表达系统，可以应用放射性标记、次级信号测定、离子成像、基因沉默等方法研究基因的功能（Towers and Sattelle, 2002; Jurat-Fuentes and [Adang,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Adang%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16893170) 2006; Stramer *et al*., 2005）。此外，S2细胞系也被广泛用于研究RNA干扰的机理

(Rand *et al*., 2005; Chien *et al*., 2006; Saleh *et al*., 2006)。

### **1.6.3** 昆虫培养细胞在植物病毒研究中的应用

植物病毒主要由蚜虫、粉虱、蓟马、叶蝉和飞虱等昆虫传播（Hogenhout *et al*.，

2008）。病毒在昆虫体内的侵染是一个复杂而有序的过程，然而由于多种因素的制约，目前对大多数植物病毒与介体昆虫的互作机理仅停留在传统生物学研究水平，阻碍了对病毒侵染分子机理的研究。昆虫培养细胞具有一致性和可重复性，且易于人为控制各种实验条件，因此成为研究病毒在细胞内侵染循环机理的理想平台。

昆虫培养细胞可用于鉴定植物病毒编码的蛋白在病毒侵染过程中的定位和功能；研究病毒在细胞中的侵染途径、复制过程和扩散方式；也可用于筛选和验证参与病毒侵染的介体因子。目前用于植物病毒研究的昆虫培养细胞较少，主要有蓟马原代培养细胞、蚜虫原代培养细胞和叶蝉培养细胞。其中蓟马原代培养细胞用于研究TSWV与不同蓟马的专化性侵染（Nagata *et al*., 1997）；蚜虫原代培养细胞用于研究苦苣菜黄脉病毒（*Sowthistle yellow vein virus*）的侵染特性（Peters and Black, 1970）；黑尾叶蝉培养细胞的应用比较广泛，已成功地用于研究RDV的侵入、复制及扩散机理。应用叶蝉培养细胞已明确了RDV的Pns10形成包裹病毒粒体的管状结构并参与病毒的胞间扩散（Wei *et al*., 2006a）；RDV的外壳蛋白P2在病毒侵入过程中诱发细胞的膜融合（Zhou *et al*., 2007）；RDV编码的非结构蛋白Pns6、Pns11和Pns12聚集形成病毒原质的基质，提供病毒复制和装配的场所（Wei *et al*., 2006b）；另外，叶蝉培养细胞还用于研究RGDV在细胞内的扩散机理（Wei *et al*., 2009）。因此，昆虫培养细胞将成为深入研究虫传植物病毒侵染机理的必备条件，并将推动植物病毒研究的快速发展。

由于新的昆虫细胞系的建立是一项既费时又费力，且很难预测其结果，因此在研究未建立介体培养细胞的病毒编码蛋白时，可借助非寄主昆虫细胞系研究植物病毒编码蛋白的功能。Sf9细胞系作为昆虫杆状病毒表达系统的荷载体，不仅可用于表达外源蛋白，还可用于研究病毒编码蛋白的亚细胞定位及互作等功能。

Maroniche等（2010）通过在Sf9细胞中表达MRCV编码的蛋白，明确了P9-1蛋白是形成病毒原质的组分；Akita等（2011）利用Sf9细胞表达并纯化RBSDV编码的P9-1蛋白，研究P9-1蛋白的自身互作结构域和三维结构。Sf9细胞是目前使用最为广泛的非寄主昆虫细胞，在植物病毒的研究中发挥了巨大的作用。

## **1.7** 本研究的目的和意义

SRBSDV属于呼肠孤病毒科斐济病毒属的一个暂定种（周国辉等，2008），周国辉等于2001年首次发现由SRBSDV引起的水稻病害，随后几年内该病害在我国广东和海南省逐步蔓延发生，直至2008年，该病害才引起农业部及广大科研工作者的关注。2009和2010年，由SRBSDV导致的南方水稻黑条矮缩病在我国南方稻区大面积流行暴发。然而由于SRBSDV是新发现的病毒，且由新的介体白背飞虱传播，因此对该病害的发生规律，病害特征及病毒与介体、寄主的互作关系等知之甚少，从而严重影响了对该病害的及时防控。近两年，南方水稻黑条矮缩病虽然在我国的发生相对减轻，但在多个省份仍有局部的发生，且该病害不仅可以侵染水稻，还可以危害玉米，因此对我国的粮食生产仍具有潜在的威胁。由于植物一旦感染病毒病即没有任何措施进行挽救，目前最直接的方法是阻断病毒的传播途径，如铲除田间发病植株，减少病原物的来源，或通过防虫网或农药控制田间的介体昆虫数量。然而，SRBSDV的介体白背飞虱属于迁飞性的水稻害虫，每年春季大批量地从东南亚国家随合适的气流迁飞到我国南方的水稻种植区，随后不断向北迁飞，因此给田间的介体昆虫防控带来了巨大的困难。由于病毒与介体的互作关系在病三角关系中起着重要的作用，因此亟需明确病毒与传播介体的互作关系，为建立有效的病害防控措施提供科学依据。

SRBSDV属于持久增殖型方式传播的病毒，由介体白背飞虱传播。持久增殖型病毒进入昆虫体内后需要一个特定的循回期才能侵染新的寄主，循回期内病毒在昆虫体内需进行大量的增殖，并从消化道扩散到唾液腺。扩散过程中病毒需突破多重侵染屏障，包括中肠侵入屏障、中肠释放屏障、唾液腺侵入屏障和唾液腺释放屏障等（Ammar and Hogenhout, 2008）。因此，病毒在昆虫体内的侵染循回是一个复杂而有序的过程，研究并掌握SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回过程，将为选择合适的作用位点阻断病毒在昆虫体内的侵染提供理论依据。此外，

SRBSDV还可以由灰飞虱低效带毒，但不能传毒，而且SRBSDV还可以侵染玉米。研究发现白背飞虱种群通常可达到80%以上带毒率，而灰飞虱种群仅有5%左右的带毒率，且迄今尚未有灰飞虱可以有效传毒的证据。灰飞虱主要分布在我国的长江中下游和华北地区，是RBSDV的传播介体。SRBSDV与RBSDV具有较高的同源性，SRBSDV有可能存在适应灰飞虱传播的风险，由灰飞虱有效传播并将病毒扩散到我国北方的水稻和玉米种植区，从而加重SRBSDV对我国粮食生产的危害。本研究将分析灰飞虱不能有效传播SRBSDV的机理，从组织水平明确

SRBSDV在灰飞虱体内被阻断的侵染屏障，为病害发生的风险预测提供理论依据。

近年来关于SRBSDV的研究主要集中于对病毒基因组的序列分析、介体昆虫的传毒特性和病害检测等，而对SRBSDV与介体白背飞虱之间互作的分子机理还

没有深入的研究。持久增殖型病毒在介体昆虫细胞内的侵染包括侵入、复制、装配和扩散过程，病毒侵入介体细胞后即开始复制和装配，增殖后的病毒必须扩散才能从初侵染位点到达唾液腺，从被介体有效传播，因此持久增殖型病毒在介体内的复制和扩散至关重要，直接关系着介体昆虫能否有效地传播病毒。本论文将针对SRBSDV与白背飞虱的互作关系，应用RNAi技术在介体培养细胞和昆虫个体水平深入研究参与病毒复制和扩散的病毒蛋白，明确病毒的复制机理和扩散方式，同时为选择合适的靶标基因应用RNAi原理培育转基因水稻抵抗病毒的侵染奠定基础。

此外，伴随着SRBSDV的发生，RRSV近年来再次在我国南方稻区和东南亚国家发生。RRSV作为上世纪70年代末期发现的水稻病毒，国内外水稻病毒研究者已做了大量的工作，目前已明确了该病毒的基因组序列、部分病毒蛋白的功能、介体褐飞虱的传毒特性等，然而关于RRSV在介体褐飞虱体内侵染和扩散的过程以及病毒复制机理还不清楚。本论文将在组织水平阐述RRSV在褐飞虱消化系统的侵染过程，鉴定参与RRSV复制的病毒编码的非结构蛋白，从而为选择合适的靶标基因应用RNAi原理培育转基因水稻抵抗RRSV的侵染奠定基础。

# **2.** **SRBSDV**在介体内的侵染循回过程

SRBSDV由介体白背飞虱以持久增殖型方式传播，同时也可以由灰飞虱带毒，但不能传毒。持久增殖型病毒在介体体内可以增殖和扩散，通常的侵染循回过程是昆虫在病株上取食时病毒随汁液进入昆虫的肠腔，随后进入中肠或后肠的上皮细胞并进行复制，然后扩散到其他器官或血淋巴，最后扩散到唾液腺并进行复制，当昆虫再次取食时，病毒随唾液传到健康植物寄主。

目前针对介体白背飞虱传播SRBSDV的传毒特性已有较多的研究，已明确白背飞虱可以高效带毒和传毒，然而对病毒在介体内的侵染过程还不清楚。弄清病毒在介体内的侵染循回过程，可以从更深层次理解和阐明白背飞虱对SRBSDV的传毒机理。此外，已知灰飞虱可以低效带毒却无法传毒，其机理还不清楚。本章节拟用免疫荧光标记技术系统地分析SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回过程，同时也分析SRBSDBV在灰飞虱体内的侵染屏障，以阐明白背飞虱高效传毒以及灰飞虱不能传毒的机理。

## **2.1** 材料与试剂

### **2.1.1** 水稻病毒毒源和介体昆虫

感染SRBSDV的水稻病株采自湖南省芷江市，种植在本所实验室田间水稻病毒圃。介体白背飞虱和灰飞虱采自福建农林大学水稻育种实验田，并于温室中

25℃条件下饲养在水稻幼苗上。成虫期的白背飞虱和灰飞虱在水稻幼苗上产卵3 d，产卵后10-12d孵出1龄若虫，生长到2龄的若虫用于实验。

### **2.1.2** 实验试剂与抗体

二甲基甲酰胺（DMF）、荧光素粉、荧光抗衰减液购自Invitrogen公司；多聚甲醛、Triton-100、phalloidin–rhodamine购自Sigma公司；牛血清蛋白（BSA）、

NaHCO3购自厦门泰京公司；Protein A IgG purification kits购自Thermo公司。

SRBSDV的外壳蛋白P10抗血清由本实验室制备保存。

## **2.2** 实验方法

### **2.2.1** 提纯抗体**IgG**

外壳蛋白P10的IgG采用Thermo公司的蛋白A亲和柱从抗血清中提纯获得，IgG提纯的操作步骤为：

##### （1) 取下亲和柱上下两端的盖子，使亲和柱内的保护液自然下滴；

##### （2) 待柱顶没有液体时向柱顶加入5-15ml的Binding buffer，使液体自然下滴

清洗亲和柱；

(3)清洗完后将3-5ml的抗血清加入亲和柱顶，使其自然下滴并与亲和柱吸附；

(4)待亲和柱顶部没有抗血清时，加入5-15 ml Binding buffer清洗亲和柱内未被吸附的IgG和其他物质，同时用2 ml的离心管收集洗涤后的液体，每2 ml收集到一个离心管中，然后使用分光光度仪测定OD280的蛋白浓度，直至OD值接近空白对照时则停止添加Binding buffer；

(5)向亲和柱顶部加入5-10 ml Elution buffer，同时用1.5ml的离心管收集洗脱下来的液体，每1 ml收集1次，并使用分光光度仪测定OD280的蛋白浓度，通常洗脱下来的高浓度IgG主要分布在第2-4号离心管中，待OD值接近空白对照时则停止添加Elution buffer，高浓度IgG置于-20℃条件下保存备用；

(6)向亲和柱内加入4 ml含0.02%叠氮化钠的灭菌水，下滴1 ml后盖上亲和柱两端的盖子，并将亲和柱放入4℃冰箱保存，每只亲和柱可重复使用

10次。

### **2.2.2** 荧光抗体的交联

提纯后的IgG需与荧光素FITC交联才能获得带有荧光的抗体，荧光抗体的交联方法如下：

(1)剪取两条10 cm长直径约0.5 cm的透析袋，首先在沸水中煮3 min，再用蒸馏水清洗2次；

(2)用夹子夹紧一条透析袋的一端，向透析袋中加入100μL纯化的IgG，再用夹子夹紧另一端；

(3)将装有IgG的透析袋放入装有0.1mol/L NaHCO3的烧杯中，然后将烧杯放到磁力搅拌仪上并于4℃条件下透析，每4h更换一次透析液，更换3次；

(4)将透析结束后的IgG收集到1.5 ml的离心管中，同时向另一支1.5 ml的离心管中加入50μL二甲基甲酰胺（DMF）和适量的FITC荧光素粉并混合均匀；

(5)将混合均匀的荧光素在涡旋条件下缓慢加入装有IgG的离心管，并使两者混合均匀；

(6)将与荧光素混合后的IgG放置在摇床上室温条件下避光孵育1-2 h；

(7)将孵育后的IgG再次装入处理后的另一条透析袋中，放入装有0.01 mol/L PBS（pH 7.2）的烧杯中，然后将烧杯放到磁力搅拌仪上并于4℃条件下透析，每4h更换一次透析液，更换3次；

(8)收集交联后的荧光抗体并分装，避光保存于-20℃备用。

### **2.2.3** 白背飞虱和灰飞虱取食**SRBSDV**

选取感染SRBSDV的水稻病株，用纸包裹水稻根部的泥土后放入养虫笼中。抓取约200头1-2龄的无毒白背飞虱和灰飞虱若虫，分别在水稻病株上取食，饲毒2d后，将水稻病株取出，放入健康的水稻幼苗供飞虱取食。在饲毒后的不同时间段各取30头虫子用于解剖实验。

### **2.2.4** 解剖介体昆虫消化系统器官

飞虱的消化系统由消化道和唾液腺组成，消化道由食道、前憩室、中肠和后肠组成。唾液腺由主唾液腺和副唾液腺组成，是消化系统最前端的部分。为了明确病毒在白背飞虱体内的侵染循回过程，在饲毒后的1、3、5、6、9、12 d分别抓30头白背飞虱，显微镜下解剖获得每头虫子的消化系统器官用于免疫荧光标记实验。为了明确病毒在灰飞虱体内的侵染屏障，在饲毒后的25 d进行免疫荧光标记病毒在体内的分布，共聚焦显微镜下观察荧光。

### **2.2.5** 免疫荧光检测

解剖获得的昆虫消化系统器官参照Chen 等方法进行免疫荧光标记实验

（Chen *et al*., 2011）。免疫荧光标记的具体步骤如下：

（1）将得到的昆虫消化系统器官放在4%的多聚甲醛固定液中固定2 h；

(2)固定结束后的昆虫消化系统器官于0.01mol/L PBS（pH 7.2）溶液中清洗两次；

(3)把清洗后的消化器官放入含2% Triton-100的PBS溶液中渗透30min；

(4)将荧光抗体与含3%BSA的抗体稀释液按1: 50稀释于0.5 ml离心管中，并用锡箔纸包裹避光；

(5)再次用0.01mol/L PBS（pH 7.2）溶液清洗两次，并加入荧光抗体

P10-FITC和phalloidin–rhodamine于37℃恒温孵育2 h；

(6)孵育结束后，再次用0.01mol/L PBS（pH 7.2）溶液清洗两次；

(7)向洁净的载玻片上滴一滴抗荧光衰减液，将清洗后的消化道器官摆放在抗衰减液中并盖上盖玻片，共聚焦显微镜下观察病毒在虫体内的分布。

## **2.3** 结果与分析

### **2.3.1** 白背飞虱消化系统

解剖后的白背飞虱消化系统肌动蛋白（Actin）用phalloidin–rhodamine进行免疫荧光标记，通过共聚焦显微镜观察，可以明确其消化系统由食道、前憩室、中肠、后肠和唾液腺组成。其中中肠从内到外分别是肠腔、单层上皮细胞、基底膜和肠道表面的肌肉组织，在上皮细胞靠近肠腔一侧分布着大量的微绒毛，而中肠外表的肌肉组织则由环肌和纵肌组成（图2-1）。

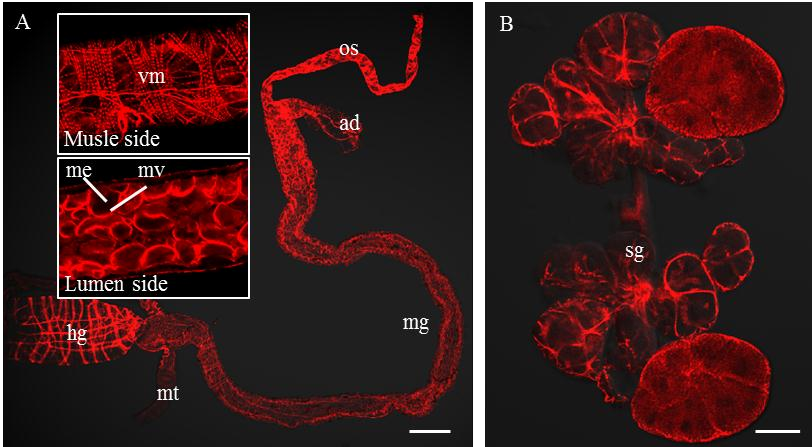


图2-1 白背飞虱消化系统

Fig. 2-1. The digestive system of WBPH

A, The alimentary canal of WBPH; B, The salivary gland of WBPH. ad, Anterior diverticulum; mg, midgut; hg, hindgut; mt, malpighian tubules; os, oesophagus; sg, salivary gland; me, midgut epithelium; mv, microvilli; vm, visceral muscle; Bars, 70µm.

### **2.3.2** **SRBSDV**在白背飞虱消化系统的侵染循回过程

为了明确SRBSDV在介体白背飞虱消化系统的侵染过程，在病毒侵染后的不同时间段，将解剖获得的白背飞虱消化道组织经过固定、渗透和抗体孵育，共聚焦显微镜下观察病毒外壳蛋白P10在白背飞虱消化系统的分布。实验中用P10-FITC标记昆虫消化系统中病毒的P10蛋白（绿色），phalloidin–rhodamine标记昆虫消化系统的肌动蛋白Actin（红色）。在饲毒后的1、2、4、6、8、和10 d分别解剖30头白背飞虱，P10蛋白在不同器官的分布如表2-1所示。在白背飞虱饲毒1 d后，90%以上的白背飞虱中肠肠腔内可以观察到P10蛋白（图2-2A），表明大量的病毒粒体在昆虫取食过程中随汁液进入中肠肠腔。饲毒后2 d，约80%白背飞虱的中肠上皮细胞中可以观察到P10 蛋白的分布，而肠腔内已观察不到

P10蛋白，表明病毒已侵入中肠上皮细胞并进行复制，而且肠腔内的病毒粒体除少量侵入中肠上皮细胞外，其余的全部被排出体外（图2-2B）。饲毒后4 d，80%以上的白背飞虱中肠上皮细胞可观察到大量的P10蛋白（图2-2C），同时约20%的白背飞虱中肠表面的肌肉组织也观察到少量的P10 蛋白（表2-1），表明病毒在白背飞虱的中肠上皮细胞进行了大量的复制，且部分病毒已开始从上皮细胞向中肠表面的肌肉组织扩散。饲毒后6 d，80%以上的白背飞虱中肠表面的肌肉组织可以观察到大量的P10蛋白（图2-2D, E），中肠上皮细胞内也存在P10蛋白（图2-2F），同时约20%的白背飞虱后肠、食道、前憩室以及唾液腺中也可以观察到

P10蛋白，表明病毒已大量扩散到中肠表面的肌肉层，且部分病毒已扩散到唾液腺（图2-2G）。饲毒后8 d，80%的白背飞虱中肠和后肠表面肌肉组织能观察到大量的P10蛋白（图2-2H），约70%的唾液腺也存在P10蛋白（图2-2I），但此时中肠上皮细胞内未观察到P10蛋白，表明中肠上皮细胞内的病毒已经完全扩散到中肠和后肠表面的肌肉层，且大部分昆虫体内的病毒已扩散到唾液腺。饲毒后10 d，大量的P10蛋白分布在中肠、后肠、食道和前憩室外表的肌肉组织和唾液腺组织，表明病毒已达到了系统性侵染（图2-2J）。以上结果表明SRBSDV在介体白背飞虱体内首先侵染中肠上皮细胞并进行复制，随后扩散到中肠表面的肌肉组织进行复制和扩散，最后扩散到唾液腺，完成在白背飞虱体内的侵染循回过程。表2-1 病毒侵染不同时间段P10蛋白在白背飞虱消化系统的分布

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Days padp a | No. positive insects with P10 antibody in different tissues (n=30) | | | | | | |
| ml | me | vm | hg | os | ad | sg |
| 1 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 26 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 27 | 27 | 6 | 7 | 7 | 6 |
| 8 | 0 | 0 | 25 | 20 | 20 | 21 | 20 |
| 10 | 0 | 0 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |

Table 2-1. Occurrence of P10 antigens in various organs/tissues of WBPHs at different days post-first access to diseased plants(padp) as detected by immunofluorescence microscopy

a：每个时间点均解剖30头白背飞虱，使用P10-FITC抗体标记病毒在不同器官的分布；ml：中肠肠腔；me：中肠上皮细胞；vm：肠道肌肉；hg：后肠；os：食道；ad：前憩室；sg：唾液腺

### **2.3.3** **SRBSDV**在灰飞虱消化系统的分布

持久增殖型病毒在介体昆虫体内必须扩散到唾液腺才能被有效的传播，灰飞虱能够携带SRBSDV，但无法传毒。为了明确灰飞虱不能传播SRBSDV的机理，本研究将灰飞虱在SRBSDV侵染的水稻病株上取食2 d后转到健康水稻幼苗上饲养25 d，然后抓取100 头灰飞虱并解剖其消化系统，利用免疫荧光标记

SRBSDV在其体内的分布。实验中用P10-FITC标记昆虫消化系统中病毒的P10蛋白（绿色），phalloidin–rhodamine标记昆虫消化系统的Actin（红色）。共聚焦显微镜观察结果显示，饲毒后25 d，在灰飞虱的中肠上皮细胞内观察到P10蛋白的分布，但在唾液腺中检测不到P10蛋白（图2-3），表明SRBSDV可以侵染灰飞虱消化道，但无法扩散到唾液腺，从而不能被有效传播。

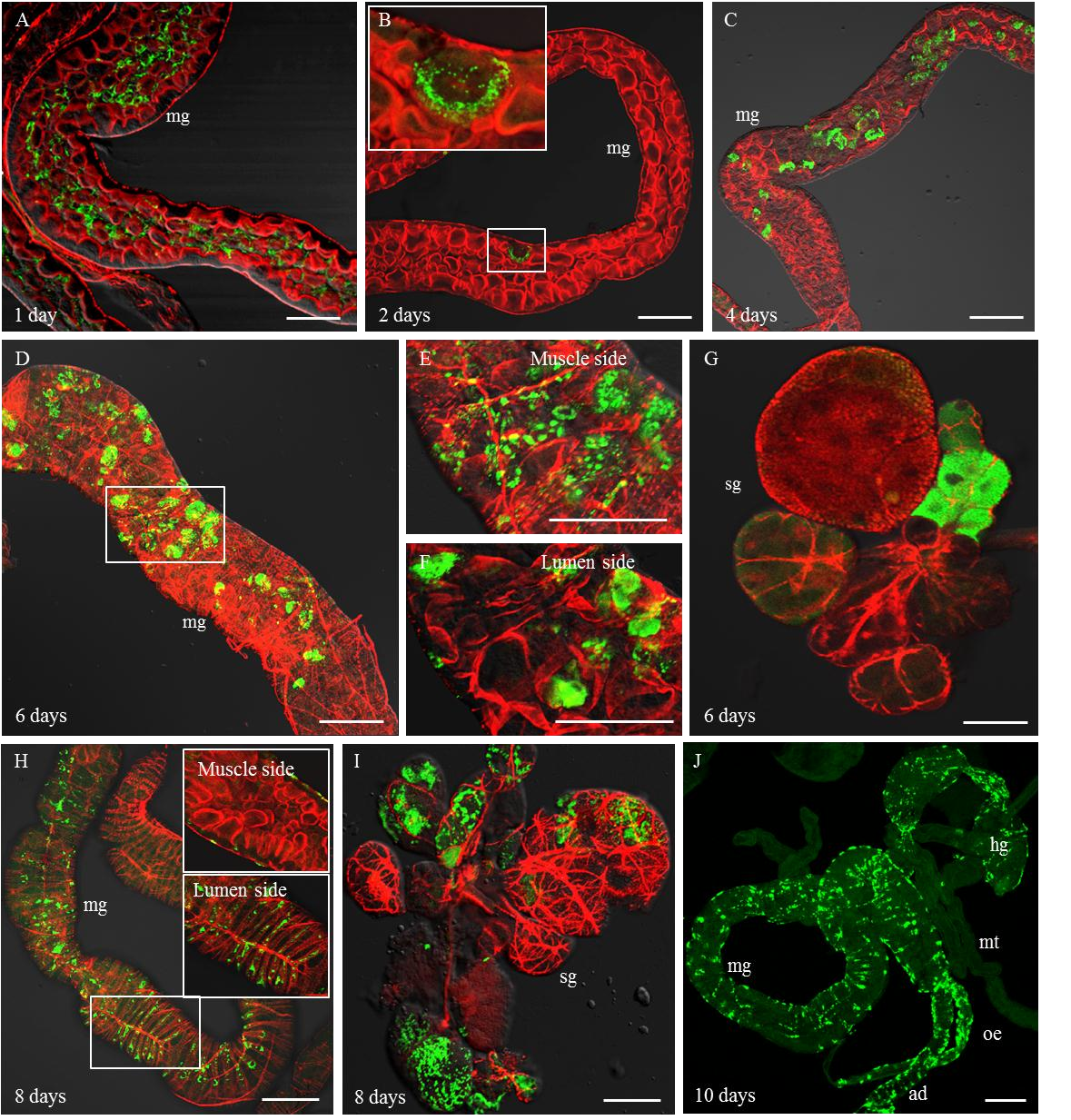


图2-2. SRBSDV在白背飞虱消化系统的侵染循回途径

Fig. 2-2. Infection route of SRBSDV in the digestive system of WBPHs. ad, Anterior diverticulum; mg, midgut; hg, hindgut; mt, malpighian tubules; os, oesophagus; sg, salivary gland; Bars, 70µm.



图2-3. SRBSDV在饲毒后25 d的灰飞虱消化系统的分布

Fig. 2-2. The localization of SRBSDV in the digestive system of SBPH at 25 days padp. mg, midgut; sg, salivary gland; Bars, 70µm

## **2.4** 讨论

SRBSDV编码的P10蛋白是病毒粒体的外壳蛋白，其在昆虫体内存在的部位即病毒侵染后到达的部位，因此通过免疫荧光标记技术观察P10蛋白在介体白背飞虱体内的时空分布即可明确SRBSDV在介体体内的侵染循回过程。

通过对SRBSDV在白背飞虱消化系统侵染过程的观察，可以直观地解释白背飞虱的一些传毒特性。（1）进入昆虫肠腔的病毒仅有少量可以侵染昆虫。我们可以发现昆虫取食时会有大量的病毒随汁液进入昆虫的中肠肠腔，然而仅有少量的病毒粒体可以突破中肠侵入屏障进入中肠上皮细胞，因此在病株上取食后的昆虫带毒率不会达到100%。（2）白背飞虱可以高效带毒。饲毒后2 d，80%以上的白背飞虱可以带毒，带毒率远远高于褐飞虱对RRSV的带毒率（Jia *et al*., 2012c），灰飞虱对RSV的带毒率（吴维等，2012），以及灰飞虱对SRBSDV的带毒率（Pu *et al*., 2012）。白背飞虱高效的带毒率表明SRBSDV与白背飞虱中肠受体蛋白有着较高的亲和力。（3）持久增殖型病毒在介体内侵染循回到达唾液腺即完成了病毒的循回期。饲毒后6 d，部分昆虫体内病毒已扩散到唾液腺，证实了26℃饲养条件下1-2龄若虫获取SRBSDV后的最短循回期为6 d（曹杨等，2011）。（4）

SRBSDV在各器官间主要通过肠道表面的肌肉层进行扩散。SRBSDV从中肠上皮细胞扩散到中肠表面的肌肉层后，可以利用肌肉层快速扩散到与之相连的后肠、食道和前憩室。（5）白背飞虱的传毒率高。病毒在介体内必须扩散到唾液腺才具备传毒能力，而饲毒后10 d, SRBSDV可以侵染70%以上带毒白背飞虱的唾液腺，因此白背飞虱具有高达60%以上的传毒率（Jia *et al*., 2012a）。（6）持久增殖型病毒需在介体内大量地复制。SRBSDV在白背飞虱消化系统中最初仅有少量的病毒侵入中肠上皮细胞，在循回期内病毒不断进行复制，因此在白背飞虱的中肠和唾液腺中积累了大量的病毒，从而保证了病毒的扩散和有效地传播。

持久增殖型病毒在介体内需突破中肠侵入屏障、中肠释放屏障、唾液腺侵入屏障和唾液腺释放屏障才能被有效传播。已有的研究发现TSWV在不同的介体昆虫中的侵染情况不同，其在西花蓟马（*Frankliniella occidentalis*）体内可以侵染中肠和唾液腺并被有效传播，而在棉蓟马（*Thrips tabaci*）体内仅有少量的病毒存在中肠上皮细胞内，病毒受到中肠释放屏障的阻碍几乎不能扩散到中肠表面的肌肉和唾液腺，因此无法被有效传播（Nagata *et al*., 2002）。本研究中SRBSDV可以由灰飞虱携带，但无法被有效传播。实验室条件下发现灰飞虱仅有3.7%的带毒率（Pu *et al*., 2012），表明SRBSDV受到灰飞虱中肠侵入屏障的阻碍而使灰飞虱带毒率低。本研究对饲毒后25 d的灰飞虱消化系统进行免疫荧光标记，在中肠上皮细胞内检测到病毒，而在唾液腺中未检测到，表明病毒可以侵染灰飞虱

中肠，但由于受到中肠释放屏障的阻碍，使病毒侵染25 d后仍分布在中肠内，无法扩散到唾液腺。因此认为灰飞虱的中肠释放屏障是导致其无法传播SRBSDV的主要原因。

目前，在我国发生的水稻病毒病均由介体昆虫传播，且大多是以持久增殖型方式进行传播，SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回过程大体上遵循了持久增殖型病毒的侵染循回过程，但又具有自身的特征。关于水稻呼肠孤病毒的侵染循回已有多篇报道，如RDV和RRSV（Chen *et al*., 2011; Jia *et al*., 2012c）。这几种病毒虽然都属于由介体昆虫传播的植物呼肠孤病毒，但由于基因组和传播介体的差异使它们在介体内的侵染循回过程又各有特点。呼肠孤病毒科的RDV属于植物呼肠孤病毒属，其传播介体是黑尾叶蝉，由于SRBSDV与RDV属于不同属且传播介体不同，因此两者的侵染循回过程也存在较大的差异（Chen *et al*., 2011）。首先，病毒的初侵染点不同，SRBSDV 首先侵染中肠的上皮细胞进行复制，而

RDV在介体叶蝉体内首先到达滤室的上皮细胞进行初侵染复制；其次，病毒从中肠释放的方式不同，SRBSDV从上皮细胞穿过基底膜直接到达中肠表面的肌肉层，而RDV则从滤室扩散到前憩室和前中肠，病毒在未到达其他器官之前迅速扩散到与中中肠和马氏管相连接的神经系统；第三，病毒在介体内的循回期不同，SRBSDV的最短循回期为6 d，而RDV的循回期为12 d（Chen *et al*., 2011）。此外，RDV可侵染虫卵，可经卵传播给后代，而SRBSDV不能通过卵进行垂直传播。本研究首次明确了进入白背飞虱肠腔的SRBSDV受到中肠受体蛋白的制约仅有少量病毒粒体可侵入中肠上皮细胞，然而SRBSDV一旦侵入中肠上皮细胞，即可大量地增殖，将病毒扩散到昆虫体内的各个部位。因此认为以参与病毒侵入的昆虫受体蛋白和病毒复制的关键因子作为RNAi的靶标，可以有效地阻碍病毒在介体昆虫体内的侵染和增殖。

本研究阐明了SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回过程，明确了SRBSDV无法被灰飞虱有效传播的原因，为制定合理有效的防控措施和评估病害扩散的风险提供了理论依据。

# **3.** **P9-1**蛋白参与**SRBSDV**的复制

SRBSDV由白背飞虱以持久增殖型方式传播，持久增殖型病毒与其他类型病毒的显著区别是必须在介体内增殖才能被有效传播，因此病毒在介体内的复制必不可少。目前已知介体白背飞虱可以高效地传播SRBSDV，而关于SRBSDV编码的蛋白参与病毒复制的研究较少，病毒在寄主内的复制机理还不清楚，因此研究SRBSDV在白背飞虱体内的复制机理有助于进一步明确白背飞虱高效传播SRBSDV的机理。

SRBSDV编码的非结构蛋白P9-1与RBSDV编码的P9-1蛋白氨基酸有77%的同源性。已知RBSDV编码的P9-1蛋白是病毒原质基质的组分；P9-1蛋白可以通过自身互作在拟南芥原生质体和Sf9细胞中表达形成类似于病毒原质的包含体；P9-1蛋白可以通过疏水区的互作形成二聚体，再由每个二聚体的C端伸向邻近的二聚体并通过疏水区互作形成四聚体（Isogai, 1998; zhang, 2008; Akita *et al*., 2012）。Shimizu等应用RNAi技术获得的表达P9-1基因dsRNA的转基因水稻可以有效地抑制病毒的侵染，证明P9-1蛋白与病毒的复制有关（Shimizu *et al*., 2011）。因此推测SRBSDV编码的P9-1也可能是形成病毒原质基质的组分，与病毒的复制有关。

本章节首先制备了P9-1蛋白的抗体，用于后续基因功能的研究；其次，应用免疫荧光标记非寄主细胞Sf9中表达的P9-1蛋白和病毒侵染白背飞虱培养细胞表达的P9-1蛋白，明确了P9-1蛋白是形成病毒原质的组分；随后应用dsRNA诱导的RNAi技术在白背飞虱培养细胞水平证明了P9-1蛋白参与病毒的复制，同时通过膜饲喂人工合成的dsRNA在白背飞虱体内也验证了P9-1蛋白参与病毒的侵染和复制。

## **3.1** 材料与试剂

### **3.1.1** 毒源和虫源

感染SRBSDV的水稻病株采自湖南省芷江市，采回后种植在本所实验室田间水稻病毒圃。介体白背飞虱采自福建农林大学水稻田，并于25℃条件下饲养在水稻幼苗上。成虫期的白背飞虱在水稻幼苗上产卵3 d，产卵后10-12 d孵出 1

龄若虫，生长到2龄的若虫用于实验。

### **3.1.2** 菌株、载体和昆虫培养细胞

大肠杆菌（*Escherichia coli, E. coli*）DH5菌株为本实验室保存，大肠杆菌

DH10Bac菌株由北京大学李毅教授惠赠。Gateway表达系统载体pDONR221、

pDEST17和pDEST8均购自Invitrogen公司。本实验所用的Sf9细胞由北京大学李毅教授惠赠，白背飞虱培养细胞由本实验室培养保存。

### **3.1.3** 试剂与抗体

M-MuLV反转录酶和RNA酶抑制剂购自Promega公司；Phusion DNA聚合酶购自NEB公司；SFM900Ⅱ与FBS购自GIBCO公司；strep-taqⅡ单克隆抗体、Goat anti-mouse IgG-FITC、纤维素粉CF-11和BCIP/NBT均购自Sigma公司；Gateway BP Clonase Enzyme Mix、Gateway LR Clonase Enzyme Mix、Trizol、二甲基甲酰胺（DMF）、荧光素粉、荧光抗衰减液、phalloidin-rhodamine、Goat anti-rabbit IgG-AP和Cellfectin II购自Invitrogen公司；DIG northern starter kit购自Roche公司；Protein A IgG purification kits购自Thermo公司；T7 RiboMAX™Express RNAi System kits、GoTaq qPCR Master Mix购自Promega公司；戊二醛、醋酸双氧铀和柠檬酸铅购自Alfa Aesar公司；LR gold包埋剂购自London Resin公司；Goat anti-Rabbit IgG-15nm胶体金购自British BioCell International公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

## **3.2** 实验方法

### **3.2.1** **P9-1**抗体制备

#### **3.2.1.1** 引物设计

根据SRBSDV第9条链的基因序列（GenBank: HM585271.1）设计扩增P9-1

基因完整开放阅读框的引物序列P9-1GF/R，基因序列为正体，引物5' 端的

gateway重组序列为斜体，引物序列见表3-1。

#### **3.2.1.2** 提取**SRBSDV**的**dsRNA**

SRBSDV 的dsRNA 提取参照郭灵芳等的方法（郭灵芳等，2010），利用纤维素CF-11在17%的酒精浓度下特异吸附dsRNA的原理提取SRBSDV侵染的水稻病株中的病毒基因组dsRNA，经TE溶液溶解后的dsRNA通过6%的SDS-PAGE凝胶电泳检测，-20℃保存备用。

#### **3.2.1.3** 构建**P9-1**原核表达载体

以提取的dsRNA为模板，P9-1R为引物，参照promega公司的M-MuLV反转录酶试剂盒说明书进行反转录获得单链cDNA。以获得的cDNA为模板，P9-1F/R为特异性引物，NEB公司的Phusion DNA聚合酶扩增P9-1目的基因片段。PCR结束后的产物通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测，并将扩增到的目的条带割胶回收，使用天根公司的DNA凝胶回收试剂盒纯化目的基因片段。

**1. 构建P9-1的gateway入门载体**

按照Invitrogen公司的Gateway BR Clonase Enzyme Mix试剂盒说明将回收的目的基因片段与gateway入门载体pDONOR221按以下反应体系混合，25℃条件下重组反应2 h。

回收产物1.2μl

pDONOR221载体0.4μl

BP酶0.4μl

重组产物通过热击法转化大肠杆菌DH5α感受态，卡那霉素（Kanamycin，

Kan）抗性培养基上筛选含有重组质粒的阳性菌落。按照天根公司质粒提取试剂盒说明书提取重组后的质粒。获得的重组质粒作为模板按照扩增P9-1基因片段的反应体系和反应条件用Dream Taq酶进行PCR，琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的质粒送华大基因公司测序，序列正确的质粒即为构建成功的P9-1入门载体pDONOR221-P9-1。

**2. 构建P9-1的原核表达载体**

按照Invitrogen公司的Gateway LR Clonase Enzyme Mix试剂盒说明将入门载体pDONOR221-P9-1与gateway表达载体pDEST17按以下反应体系混合，25℃条件下重组反应2 h。

pDONOR221-P9-1质粒1.2μl

pDEST17载体0.4μl

LP酶0.4μl

通过热击法将重组产物转化大肠杆菌DH5α感受态，并涂布于含氨苄青霉素

（Ampicillin, Amp）的抗性LB平板上进行筛选。挑取单菌落到3 ml含有Amp抗生素的LB液体培养基中进行大量繁殖，按照天根公司质粒提取试剂盒说明书提取重组后的质粒。获得的重组质粒作为模板按照扩增P9-1基因片段的反应体系和反应条件用Dream Taq酶进行PCR，琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的质粒即为构建成功的P9-1表达载体pDEST17-P9-1。

#### **3.2.1.4** **P9-1**蛋白的原核表达

通过热击法将SRBSDV-P9-1的原核表达载体pDEST17-P9-1转入大肠杆菌

Rocceta菌株，并涂布于含Amp和氯霉素（Chloramphenicol, Chl）的抗性LB平板上进行筛选。挑取单菌落到3 ml含有Amp和Chl的LB液体培养基中进行大量繁殖。获得的菌液作为模板，使用Dream Taq酶进行菌液PCR，琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的质粒即为含有表达载体pDEST17-P9-1的阳性菌。

P9-1蛋白的诱导表达和检测方法为：

(1)将pDEST17-P9-1的阳性菌以1: 100接种到两管含Amp和Chl抗性的3 ml

LB液体培养基中，置于37℃摇床以220 rpm培养3-4 h；

(2)当OD600为0.6-0.8时，同时取出摇床上的两管菌液并置于冰上10 min，其中一管中加入IPTG使终浓度为0.01 mol/L，另一管中不加IPTG作为对照，然后置于22℃摇床上160 rpm培养4 h；

(3)各取1 ml 菌液于1.5 ml离心管中，12000 rpm离心1 min，除去上清，

并向沉淀中分别加入50μl 1×SDS Loading buffer，水浴锅中煮10 min；

(4)制备12%的SDS-PAGE凝胶，各取10μl样品和蛋白marker加入点样孔，80 V电泳20 min，使样品从浓缩胶进入分离胶，随后120 V电泳1 h将蛋白分离；

(5)将凝胶取下放入考马斯亮蓝染色液，放置于摇床上染色1 h；

(6)倒掉染色液，加入蒸馏水于微波炉中加热煮沸3 min，更换蒸馏水重复 3

次即可快速完成脱色。

(7)比较IPTG诱导样品与对照样品的蛋白条带差异，结合蛋白marker分析是否有目的蛋白诱导表达。

#### **3.2.1.5** **P9-1**抗体制备

按照3.2.1.4的方法大量诱导表达目的蛋白，参照李春波等方法（李春波等，

2003）将表达的目的蛋白经12%的SDS-PAGE凝胶电泳分离后放入0.1M预冷的

KCL溶液中染色，5 min后即可观察到蛋白条带呈乳白色，用刀片将目的蛋白条带切割回收。回收的目的蛋白参照周剑雄方法静脉注射新西兰大白兔制备抗体

（周剑雄，2010），经过五次注射，动脉取血获得P9-1 蛋白的抗血清，-80℃保存备用。

#### **3.2.1.6** **Western blot**检测抗体

**1. SRBSDV病毒蛋白的提取**

(1)分别称取1 g感染SRBSDV的水稻病叶和1 g健康水稻叶片，用液氮研磨后各加入2 ml蛋白提取液（配方见附录），充分混匀后装入离心管，室温静置10 min；

(2) 4℃，12000 rpm离心20 min，收集上清于新离心管，于-20℃冰箱放置30 min；

(3)冰箱中取出离心管，4℃，12000 rpm离心10 min，收集上清，获得感病水稻和健康水稻的蛋白样品。

**2. Western blot检测**

##### （1) 将提取的蛋白与5×SDS loading buffer按4:1的比例混匀，水浴锅中煮

10 min；

##### （2) 取10μl感病水稻和健康水稻蛋白分别加到12%的SDS-PAGE凝胶点样孔，同时取8μl蛋白marker加入旁边点样孔，然后电泳；

##### （3) 电泳结束后将凝胶取下浸入转移缓冲液中，同时将与凝胶大小一致的

PVDF膜先在甲醛溶液中浸泡10 s，再在蒸馏水中浸泡3 min，最后也浸泡在转移缓冲液中；

##### （4) 凝胶和PVDF膜浸泡20 min后，按滤纸、PVDF膜、凝胶、滤纸的顺序从电转夹的正极铺向负极，60 V恒压转膜30 min；

##### （5) 将转印后的PVDF膜用PBS清洗后，浸入含3%BSA的封闭液中，室

温下置于摇床上孵育1 h；

##### （6) 将PVDF膜用PBST洗3次，每次10 min，加入制备的P9-1抗血清于

37℃孵育1 h；

##### （7) 将PVDF膜用PBST清洗3次后放入稀释后的羊抗兔IgG溶液中，37℃孵育1 h；

##### （8) 将PVDF膜用PBST清洗3次后于BCIP/NBT显色液中避光进行显色反应，10 min后即可观察结果。

#### **3.2.1.7** 抗体与荧光素交联

收集到的抗血清参照2.2.1和2.2.2方法进行提纯和交联，提纯的P9-1蛋白

IgG分别与FITC和rhodamine交联，得到P9-1-FITC和P9-1-rhodamine抗体。

### **3.2.2** **P9-1**和**P9-1ΔC**蛋白在**Sf9**细胞中的表达

由于SRBSDV编码的P9-1蛋白与RBSDV编码的P9-1蛋白亲缘关系较近，已知RBSDV的P9-1蛋白在非寄主细胞中形成类似于病毒原质的颗粒状结构，并且C端的20个氨基酸与蛋白的自身互作形成聚集体有关，因此推测SRBSDV编码的P9-1蛋白可能也具有类似的功能。本节将在Sf9细胞中单独表达P9-1和P9-1ΔC蛋白。

#### **3.2.2.1** 表达载体的构建及转化大肠杆菌**DH10Bac**

**1. 表达载体的构建**

根据SRBSDV第9条链的基因序列（GenBank: HM585271.1）设计扩增P9-1基因完整开放阅读框缺失C端20个氨基酸的引物序列P9-1ΔGF/R，基因序列为正体，引物5'端的gateway重组序列为斜体，参照3.2.1.3的方法扩增P9-1ΔC基因并重组获得入门载体pDONOR221-P9-1ΔC. 按照Invitrogen公司的Gateway LR Clonase Enzyme Mix试剂盒说明将构建好的入门载体pDONOR221-P9-1和pDONOR221-P9-1ΔC分别与gateway表达载体pDEST8按以下反应体系混合，

25℃条件下重组反应2 h。

重组入门载体质粒1.2μl

pDEST8载体0.4μl

LP酶0.4μl

通过热击法将重组产物转化大肠杆菌DH10Bac感受态细胞，并涂布于含50μg/mL Kan, 7μg/mL 庆大霉素（gentamicin, Gen），50μg/mL 四环素（Tetracycline, Tet），100μg/mL X-gal, 40μg/mL IPTG的LB平板上进行抗性筛选和蓝白斑筛选；

37℃培养48 h后，挑取白色单菌落并重新接种至新的含50μg/mL Kan, 7μg/mL Gen, 50μg/mL Tet, 100μg/mL X-gal, 40μg/mL IPTG的LB平板上，37℃培养过夜；挑取仍为白色的菌落接种于含50μg/mL Kan, 7μg/mL Gen, 50μg/mL Tet的液体LB培养基中，37℃，250 rpm震荡培养过夜，用于Bacmid DNA质粒的

提取。

**2. Bacmid DNA质粒的提取**

参照刘瑛的碱裂解方法提取Bacmid DNA质粒（刘瑛，2011），由于Bacmid

DNA质粒将用于无菌状态下侵染Sf9细胞，因此质粒提取过程需要在超净台中进行，且所用试剂均需灭菌，防止污染。以提取的DNA为模板按照扩增目的基因片段的反应体系和反应条件用Dream Taq酶进行PCR，琼脂糖凝胶电泳检测为阳性的质粒即为构建成功的重组穿梭质粒Bacmid-P9-1和Bacmid-P9-1ΔC。

#### **3.2.2.2** 重组穿梭质粒转染**Sf9**细胞

参照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统操作手册将重组穿梭质粒

Bacmid-P9-1和Bacmid-P9-1ΔC分别转染至Sf9细胞中，具体操作步骤如下：

(1)配置转染培养基（10 ml）：取8.5 ml Grace's Medium 和1.5 ml SF900Ⅲ

（含10 % FBS和2 % 的青链霉素抗生素）混合配置转染培养基；

(2)向6孔板的每个孔加入约9×105个Sf9细胞及2 ml含青链霉素培养基；

(3) 27℃培养箱中培养1 h，使细胞附着在孔底；

(4)准备转染试剂：取1μg纯化的Bacmid DNA与100μl Grace's Medium混合于0.5 ml离心管，取6μl cellfectin与100μl Grace's Medium混合于另一个

0.5 ml离心管，室温下静置15-30 min，将两管试剂合并混匀，室温再静置15-45 min；

(5)待细胞附着在孔底后，轻轻吸除表面的培养基，用2 ml Grace's Medium

洗涤Sf9细胞一次；

(6)向DNA与cellfectin的混合液中加入0.8 ml转染培养基并混匀，然后全部加到含有Sf9细胞的孔中，27℃培养箱中培养5 h；

(7)轻轻吸出六孔板孔中的上清液，加入2 ml完全培养基，于27℃培养箱中培养3-5 d。

(8)当观察到细胞在转染后有明显的侵染特征后，将六孔板中的细胞用细胞吸管吹起，并全部收集到无菌的15 ml离心管中；

(9)收集到的细胞在室温下500 g，离心5 min；

(10)离心后的上清为含有少量病毒的上清液P1，收集上清液P1并保存于4℃；

(11)为了提高病毒的含量，需用收集的P1侵染新的Sf9细胞扩繁病毒，因此再次用6孔板培养Sf9细胞，每孔细胞数约2×10 6个；

(12)室温下培养1 h，使Sf9细胞贴壁，然后向每孔中加入约1 ml的P1病毒上清液，27℃培养箱中培养48 h；

(13)培养48h的细胞中则含有较高浓度的病毒，离心收集上清液P2并保存于4℃；上清液P2即可用于后续实验。

#### **3.2.2.3** **P9-1**和**P9-1ΔC**蛋白在**Sf9**细胞中的定位

在Sf9细胞中表达的目的蛋白需通过免疫荧光标记后在共聚焦显微镜下观察，因此需要将Sf9细胞首先培养在coverglass上，然后用含重组穿梭病毒的P2上清液侵染Sf9细胞。参照wei等（2006b）方法对侵染48 h的Sf9细胞进行免疫荧光标记实验，Sf9细胞经过4%的多聚甲醛固定、2% Triton-100渗透后，加入200µl 1: 100稀释的P9-1-FITC抗体并在37°培养箱中孵育2 h，然后在共聚焦显微镜下观察荧光。

### **3.2.3** **P9-1**蛋白在白背飞虱培养细胞中的表达

#### **3.2.3.1** **SRBSDV**粗提液的提取

##### （1) 称取1 g感染SRBSDV的水稻病叶，在超净工作台中，用70%酒精将水稻病叶消毒，随后用无菌水清洗3次；

##### （2) 将水稻病叶剪碎后放入灭菌的研钵中，加入适量石英砂和1 ml His-Mg

溶液进行研磨；

##### （3) 将研磨好的残渣和汁液装入50 ml的离心管，加入10倍的His-Mg溶液；

##### （4) 4℃，2000 rpm离心5 min后收集上清；

(5)上清液在4℃，5000 rpm离心15 min，然后收集上清即为含有病毒粒子的粗提液，分装后置于-80℃保存。

#### **3.2.3.2** 白背飞虱培养细胞的维持

白背飞虱培养细胞由实验室培养并保存于液氮中，使用前参照郑爱玲方法将培养细胞复苏并在细胞培养瓶中大量传带培养（郑爱玲，2012）。

#### **3.2.3.3** 免疫荧光标记检测**P9-1**蛋白在培养细胞中的定位

病毒的侵染和荧光抗体标记均在coverglass上进行，首先将培养在细胞瓶中的培养细胞转接到直径10 mm的coverglass上培养4 d。

**1. SRBSDV粗提液侵染白背飞虱培养细胞**

##### （1) 将白背飞虱培养细胞培养在coverglass上，25℃培养箱中生长4 d；

##### （2) 待生长的单层培养细胞覆盖coverglass的80%以上后，吸除coverglass

上的培养基，并用His-Mg溶液清洗2-3次；

##### （3) 向清洗后的coverglass上加入100µl SRBSDV粗提液，室温静置2 h；

##### （4) 吸除coverglass表面的病毒粗提液，加入His-Mg溶液清洗2-3次；

##### （5) 将放置coverglass的培养皿封口后放入25℃恒温培养箱中培养。

**2. P9-1蛋白及病毒复制所形成RNA的定位**

病毒侵染培养细胞2 d后，采用3.2.2.3的免疫荧光标记方法标记白背飞虱培养细胞中由SRBSDV侵染后表达的P9-1蛋白，使用P10-FITC和P9-1rhodamine分别标记病毒的P10和P9-1蛋白，共聚焦显微镜下观察荧光。

为了明确P9-1蛋白是否是形成病毒复制场所病毒原质的组分，本研究通过

BrUTP标记病毒复制形成的RNA是否分布在P9-1形成的聚集体中，具体的方法

为：

(1)将病毒侵染2 d的培养细胞取出，用His-Mg溶液清洗coverglass 3次；

(2)每片coverglass上加入100μl 10μg/ml actinomycin D，室温孵育30 min；

(3)用His-Mg溶液清洗coverglass 1次，再用无血清无抗生素培养基洗2次；

(4)向coverglass上加入100μl含10mM BrUTP和8% cellfection的无血清无抗生素培养基，室温放置40 min；

(5)除去coverglass上的试剂，并用PBS溶液清洗2次；

(6)参照3.2.2.3的免疫荧光标记方法进行固定和渗透反应；

(7)加入Brdu抗体，37℃孵育1.5 h；

(8)用1×PBS溶液清洗coverglass 3次，加入Goat anti-mouse IgG-FITC和P9-1-rhodamine抗体，37℃孵育1.5 h；

(9)用1×PBS清洗coverglass 3次，向载玻片中央加一滴抗衰减液，

coverglass正面朝下覆盖在抗衰减液液滴上，通过共聚焦显微镜观察荧光。

#### **3.2.3.4** 电镜观察**P9-1**蛋白在培养细胞中的定位

为了检测SRBSDV编码的P9-1蛋白是否是病毒复制的场所，对病毒侵染的白背飞虱培养细胞分别进行常规电镜切片处理和免疫电镜切片处理，然后在电子显微镜下观察培养细胞中P9-1与病毒粒子的分布关系。

**1. 常规电镜切片的操作方法为：**

##### （1) 前固定：病毒侵染培养细胞2 d后，向培养细胞的coveglass上加入200μl

2.5%戊二醛（0.1 mol/L缓冲液配）固定液，室温固定2 min；

(2)漂洗：倒掉coverglass上的戊二醛固定液，用0.1 mol/L缓冲液漂洗3次，每次至少15 min；

(3)后固定：加入100μl 1%锇酸（0.1 mol/L缓冲液配）固定，通风柜中固定1-2 min；

(4)漂洗：将锇酸固定液倒入专用废液瓶内，用0.1 mol/L缓冲液漂洗样品 3

次，每次至少15 min；

(5)梯度脱水：依次用浓度为50%、70%、80%、90%、95%的乙醇进行脱水，每个梯度脱水15 min，100%脱水30 min，100%丙酮脱水30 min；

(6)梯度渗透：丙酮与spurr包埋剂1: 1混合，加到coverglass上，渗透1 h后倒掉；丙酮与包埋剂1: 3混合，加入coverglass上，渗透3 h后倒掉；将100%的包埋剂加到coverglass上，渗透5 h或过夜；

(7)包埋：将coverglass用滤纸吸干后倒扣在装满纯包埋剂的离心管上，在离心管壁内放入用铅笔标有样品名称的小纸条；

(8)聚合：在专用聚合器中70℃聚合24 h；

(9)切片：聚合后的样品在超薄切片机上切片，并将切片收集在铜网上；

（10）染色：用醋酸双氧铀染色液染色15 min，双蒸水漂洗3次，用滤纸吸干；

（11）透射电子显微镜下观察切片。

**2. 免疫电镜切片的操作方法为：**

(1)向coverglass上被病毒侵染的培养细胞表面滴200µl含2.5%戊二醛的磷酸缓冲液（pH 7.2），4℃固定2h；

(2)用磷酸缓冲液清洗4次，每次清洗时间为5 min；

(3)依次向coverglass上加入30%、50%的乙醇溶液，4℃冰箱中进行脱水，脱水时间均为30 min；

(4)依次向coverglass上加入预冷的50%、70%、90%、100%乙醇溶液，在

-20℃的冰箱中进行脱水，时间均为1 h，在进行100%乙醇溶液脱水时要不断地轻轻摇动样品；

(5)依次向coverglass上加入30%、70%、100%的LR GOLD溶液，-20℃冰箱中进行渗透，渗透时间均为1 h；

(6)加入100% LR GOLD+0.1% BANZIL溶液渗透3 h；

(7)将样品埋于100% LR GOLD+0.1% BANZIL的胶囊中。尽量缩短操作时间，防止样品吸水受潮。

(8)在-20C长紫外线照射聚合96 h。注意每天翻动样品2次，使紫外光照射均匀；

(9)聚合后的样品及时进行切片，并将超薄切片收集在镍网上；

（10）双蒸水漂洗2 min（在培养皿中铺上Parafilm膜，四周加吸水纸和水以保湿；加一滴双蒸水，镍网切片向下漂洗）；

（11）Parafilm膜上滴50µl封闭液，镍网切片向下封闭30 min；

（12）将P9-1、P10抗体的IgG用封闭液BL稀释100-500倍，将镍网切片向下漂浮孵育90 min；

（13）双蒸水漂洗3次，每次5 min，除去多余的一抗；

（14）用封闭液BL再次封闭30 min；

（15）将交联胶体金的抗体用封闭液BL稀释100-500倍，标记30-60 min；

（16）双蒸水漂洗3次，每次5 min，除去未标记的胶体金探针并晾干；

（17）用醋酸双氧铀染色5 min，电子显微镜下观察切片。

### **3.2.4** **dsP9-1**对病毒在培养细胞中复制的影响

#### **3.2.4.1** **dsRNA**的合成

**1.引物设计**

根据SRBSDV第9条链的基因序列（GenBank: HM585271.1）设计位于P9-1基因开放阅读框内部的dsRNA引物P9-1T7F/R，同时以绿色荧光蛋白GFP基因的序列（GenBank: AF324407.1）设计GFP基因的dsRNA引物GFPT7F/R，基因

序列为正体，上下游引物5' 端添加的T7启动子序列为斜体（表1）。引物序列送深圳华大基因公司合成。

**2. PCR扩增目的片段**

以pDONOR221-P9-1和含有GFP基因的载体分别作为扩增P9-1和GFP的模板，用合成的特异引物扩增目的基因片段。PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检测，电泳结果为单一条带且不存在引物二聚体条带的RCR产物可直接用于合成

dsRNA的模板。

**3. dsRNA的合成与纯化**

dsRNA的体外转录合成参照T7 RiboMAX™Express RNAi System试剂盒说明书操作。具体方法为：

##### （1) 以PCR产物为模板按下列比例配置反应体系于0.2 ml DEPC处理的离心管中，PCR产物的总量至少为1µg；

PCR产物（0.2µg/µl）8µl

T7 2×buffer 10µl

T7转录酶mix 2µl

##### （2) 反应体系混匀后37℃反应45 min，70℃变性10 min，20℃或室温20 min

使两条互补的RNA链聚合形成dsRNA；

(3)加入1µl DNase和1µl稀释200倍的RNase，混匀后37℃孵育30 min，酶消化掉模板DNA和未配对形成dsRNA的单链RNA；

(4)加入0.1体积的3 mol/L碳酸氢钠溶液（pH5.2）和1体积的异丙醇，混匀后冰上放置10 min；

(5) 4℃，14000 rpm离心10 min，除去上清；

(6)用70%的乙醇洗涤沉淀一次，除去乙醇，室温干燥15 min；

(7)加入60-100µl的DEPC水溶解dsRNA沉淀，放于-20℃保存备用。

(8)分别取1µl用于琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度计测定dsRNA浓度。

#### **3.2.4.2** **dsP9-1**处理白背飞虱培养细胞

##### （1) 将白背飞虱培养细胞培养在3片coverglass上，25℃培养箱中生长4 d；

##### （2) 待生长的单层培养细胞覆盖coverglass的80%以上后，吸除coverglass

上的培养基，并用His-Mg溶液清洗两次；

##### （3) 加入2µg dsRNA与3µl cellfection，放入培养箱培养6 h；

##### （4) 用His-Mg溶液清洗1次，向清洗后的每个coverglass上加入100µl

SRBSDV粗提液，室温静置2 h；

##### （5) 吸除coverglass表面的病毒粗提液，并用His-Mg溶液清洗2次；

##### （6) 将放置coverglass的培养皿封口后放入25℃恒温培养箱中培养。

#### **3.2.4.3** 检测**dsP9-1**对培养细胞中病毒复制的影响

当细胞培养72 h后，将coverglass取出，按照3.2.2.3的免疫荧光标记方法使用

P10-FITC和P9-1rhodamine抗体同时标记病毒的P10和P9-1蛋白，共聚焦显微镜下观察荧光。

### **3.2.5** **dsP9-1**对病毒在昆虫消化系统复制的影响

#### **3.2.5.1** 膜饲喂法饲喂白背飞虱

白背飞虱为刺吸式口器昆虫，最合适的饲喂方式为膜饲喂法，于是参照Dong等方法并作调整后用于白背飞虱取食人工合成的dsRNA（Dong *et al*., 2011）。具体方法为取直径3 cm、长5 cm的塑料透明管，先将管的一端用单层Parafilm M膜包裹，将约100头1-2龄白背飞虱若虫装入管中，再将另一端用双层Parafilm M膜包裹，由dsRNA和人工饲料配置的混合液则加在双层膜中间供昆虫刺吸式取食，饲喂装置如图3-1。组装后的小管放置于有固定湿度和光照的养虫笼内。



图3-1 膜饲喂装置示意图

Fig. 3-1. Schematic diagram of feeding chamber

#### **3.2.5.2** 选择合适的人工饲料

根据目前已有的人工饲料配方如10%蔗糖、D-97(Fu *et al*., 2001)、MMD-1、MED-1、MED-4（Koyama, 1988），配置不同的人工饲料并饲喂白背飞虱若虫，同时饲喂蒸馏水作为对照，通过观察昆虫的取食倾向性找到最佳的人工饲料。

#### **3.2.5.3** **dsRNA**的稳定性

为了明确dsRNA在饲喂过程中的完整性，首先将dsRNA与人工饲料的混合液分别放置0、6、12、18、24 h，然后收集含有dsRNA的混合液，通过琼脂糖凝胶电泳分析dsRNA在人工饲料中是否被降解。

#### **3.2.5.4** 膜饲喂法饲喂**dsRNA**的浓度

为了确定dsRNA 的最适饲喂浓度，通过比较饲喂不同浓度源于白背飞虱

*Actin*基因的dsRNA后产生的干扰效果，确定饲喂白背飞虱所需的dsRNA浓度。

**1.合成白背飞虱*Actin*基因的dsRNA**

由于白背飞虱*Actin*基因序列未知，本实验根据昆虫肌动蛋白基因（*Actin*）的高度保守性，以褐飞虱*Actin* 同源基因序列(GenBank: EU179847.1)设计引物

ActinF/R用于扩增白背飞虱*Actin*基因（表3-1）。首先通过Trizol法提取白背飞虱总RNA，用M-MLV反转录试剂盒合成单链cDNA。再以白背飞虱cDNA为模版扩增*Actin*基因，1%的琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标产物，并将其克隆到pEASY-Blunt载体（Transgen公司）上，阳性质粒送华大基因公司测序。获得的正确基因序列即白背飞虱*Actin*序列，可用于设计合成源于白背飞虱*Actin*基因

的dsRNA引物Actin-T7F/R，基因序列为正体，T7启动子序列为斜体（表3-1）。然后参照3.2.4.1方法合成白背飞虱*Actin*基因的dsRNA。

**2. 饲喂*Actin*基因的dsRNA**

将体外合成的源于白背飞虱*Actin*基因的dsRNA与人工饲料配制成不同终浓度的dsRNA，通过膜饲喂法饲喂2龄的白背飞虱若虫，同时以人工饲料饲喂2龄白背飞虱作为对照。24 h后收集白背飞虱虫体，用于RT-qPCR检测Actin基因的干扰效果。

**3. RT-qPCR检测*Actin*基因的表达**

根据白背飞虱*Actin*基因序列设计实时荧光定量PCR引物qActinF/R，同时以组成型表达基因*18S*（GenBank: AB625607）作为内参基因设计引物q18SF/R

（表3-1）。提取收集到的昆虫样本总RNA，以oligdT18为引物反转录获得cDNA. 参照GoTaq qPCR Master Mix试剂盒操作说明配制反应体系，每个样品设3个重复，在Mastercycler realplex4实时定量PCR仪（Eppendorf, 德国）上检测目标基因的表达量。实验数据采用2-ΔΔ*C*T算法进行分析（Livak and Schmittgen, 2001），其中ΔΔ*C*T = (*C*T, *Actin* - *C*T,*18S*) x - (*C*T, *Actin* - *C*T,*18S*) ck. *C*T, *Actin*和*C*T,*18S*分别是目标基因

*Actin*和内参基因*18S*的*C*T值；x和ck分别表示dsRNA饲喂的不同时间点和对照。应用DPS7.05软件对不同处理条件下白背飞虱*Actin*基因的表达量进行显著差异性分析。

#### **3.2.5.5** 白背飞虱饲喂**dsRNA**和病毒

按照3.2.5.3的方法将dsP9-1和dsGFP分别与人工饲料混合，添加到饲喂装置一端的双层Parafilm M膜中间，同时以单独饲喂人工饲料的为对照处理。1-2龄的无毒白背飞虱取食1 d后，将其分别转移到SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻幼苗上饲养，供RT-PCR和免疫荧光标记法检测dsRNA对病毒侵染的干扰效果。

#### **3.2.5.6** **RT-PCR**检测饲喂**dsRNA**对昆虫带毒率的影响

将饲喂dsRNA并饲毒的白背飞虱在健康水稻上饲养12 d后，每个处理分别抓取100头白背飞虱，通过Trizol法提取单头虫子的总RNA。根据SRBSDV 的

S9和S10基因序列设计扩增P9-1和P10基因的特异性检测引物P9-1F/R和P10F/R（表3-1）。以提取的白背飞虱总RNA进行RT-PCR扩增P9-1和P10基因，同时以白背飞虱的*Actin*基因作为内参基因，琼脂糖凝胶电泳检测饲喂dsRNA对昆虫带毒率的影响，实验重复3次。

#### **3.2.5.7** 免疫荧光标记检测**dsRNA**对病毒在昆虫消化系统复制的影响

为了明确饲喂源于P9-1基因的dsRNA对病毒在白背飞虱体内复制的影响，将3.2.5.5中不同处理的白背飞虱分别在饲毒后的1、3、5、6、9、12 d各抓50头，按照2.2.4和2.2.5的方法在显微镜下解剖获得每头虫子的消化系统器官，并使用P9-1-rhodamine和P10-FITC抗体同时标记消化系统器官，共聚焦显微镜下

观察病毒在虫体内的复制情况。

#### **3.2.5.8** 饲喂**dsRNA**对白背飞虱传毒率的影响

将1-2龄无毒白背飞虱按照3.2.5.5方法分别饲喂dsP9-1、dsGFP及单独的人工饲料1 d后，分别在SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻幼苗上饲养10 d，分别抓取50头白背飞虱以单管单虫单苗方式接种到无病水稻

幼苗上，每次接种2 d。接种5次后，收集白背飞虱并参照3.2.5.6方法检测昆虫的带毒率。接种后的水稻在防虫条件下种植，一个月后统计水稻的发病情况，根据发病水稻计算白背飞虱的传毒率。

表3-1 本章中用到的引物

Table 3-1. Primers used in this study

| 引物 （primer） | 引物序列（sequence） |
| --- | --- |
| P9-1GF | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAGACC  TAGAGCGTAGAAC 3' |
| P9-1GR | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAACGTCC  AATTTAAGTGAAGA 3' |
| P9-1ΔGF | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAGACC  TAGAGCGTAGAAC 3' |
| P9-1ΔGR | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAAACGACG  ATATCTTTTGATGTT 3' |
| P9-1T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGTTGACAA  TTAGAAACGACCAACG 3' |
| P9-1T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAGTC  GGACTTAATAACGC 3' |
| GFPT7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGATGAGTAAAG  GAGAAGAACTT 3' |
| GFPT7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGTTATTTGTATA  GTTCATCCATG 3' |
| ActinF | 5' ATGGATAGACCTGCTCGAGAAC 3' |
| ActinR | 5' TCAAAAACAGGTAAAGTACCTGGAG 3' |
| Actin-T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGCACCGGTAT  TGTGCTCGACT 3' |
| Actin-T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGCATCTGCTGGA  AGGTGGAGAG 3' |
| qActinF | 5' GCCGTCTTTCTTGGGTATGG 3' |
| qActinR | 5' AGGGCGGTGATCTCCTTCTG 3' |
| q18SF | 5' GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG 3' |
| q18SR | 5' CATTCTCAATCAGCTTTCTTCA 3' |
| P9-1F | 5' TTGACAATTAGAAACGACCAACG 3' |
| P9-1R | 5' AGAAAAGTCGGACTTAATAACGC 3' |
| P10F | 5' TTCAACTCTCTTTTTCACGAATC 3' |
| P10R | 5' GTCTTACGCAACGATGAACCT 3' |

## **3.3** 结果与分析

### **3.3.1** **P9-1**蛋白的抗体制备与检测

#### **3.3.1.1** **P9-1**蛋白表达载体的构建

以提取的SRBSDV的dsRNA为模板进行RT-PCR，扩增P9-1基因的完整开放阅读框片段。琼脂糖凝胶电泳检测到大小约1100 bp的DNA片段（图3-2），

SRBSDV的开放阅读框为1044 bp，由于引物两端均含有30 bp的gateway重组序列，因此所扩增的片段约为1110 bp，与目的基因大小一致。目的片段经BP重组反应构建到入门载体pDONOR221，测序后正确的质粒即为pDONOR221-P9-1。将入门载体pDONOR221-P9-1与表达载体pDEST17进行LR反应，获得重组后的表达载体pDEST17-P9-1。质粒PCR检测为阳性的质粒即可用于P9-1蛋白的表达。



图3-2. P9-1基因的RT-PCR产物检测Fig. 3-2. RT-PCR product of P9-1

M, DNA Marker; 1-2, Product of the RT-PCR using P9-1 specific primer pairs

#### **3.3.1.2** **P9-1**蛋白的诱导表达

将原核表达载体pDEST17-P9-1转化到大肠杆菌Rocceta菌株，阳性菌液经

0.1 mM IPTG诱导后表达目的蛋白。通过SDS-PAGE凝胶电泳和考马斯亮蓝染色，可以在诱导菌样中检测到P9-1与6×His标签融合表达的大小约42 kDa的蛋白，与预测的蛋白大小相符，而未加诱导剂的菌样没有对应的条带（图3-3），表明P9-1蛋白被特异性诱导表达。



图3-3. SDS-PAGE分析SRBSDV P9-1蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 3-3. SDS-PAGE analysis of the expression of P9-1 protein of SRBSDV in *E. Coil*.

Lane M, protein Marker; Lane 1, Proteins expression without IPTG; Lane 2, Protein expression induced by IPTG

#### **3.3.1.3** **P9-1**蛋白抗体的检测

分别以SRBSDV侵染的白背飞虱和未侵染SRBSDV的白背飞虱总蛋白为样品，经12%的SDS-PAGE凝胶电泳后用制备的P9-1抗血清做Western blot检测，可以检测到带毒虫含有39.9 kDa的蛋白条带，与预测的P9-1蛋白大小相符，而未侵染SRBSDV的白背飞虱中检测不到P9-1蛋白，表明所制备的抗体具有特异性，可用于免疫荧光标记实验（图3-4）。



图3-4. Western blot检测SRBSDV P9-1抗体的特异性

Fig. 3-4. Western blot analyses the specificity of antibodies against P9-1.

Lane M, protein marker; Lane 1, protein extracts from WBPHs infected with SRBSDV; Lane 2, protein extracts from SRBSDV-free WBPHs.

### **3.3.2** **P9-1**蛋白在**Sf9**细胞中的表达

#### **3.3.2.1** **P9-1**蛋白表达载体的构建

将入门载体pDONOR221-P9-1与表达载体pDEST8进行LR反应，获得重组后的表达载体pDEST8-P9-1. PCR检测为阳性的质粒即可用于转化大肠杆菌DH10Bac，获得重组P9-1基因的穿梭质粒Bacmid-P9-1。同时按照构建Bacmid-P9-1的方法构建P9-1蛋白C端缺失20个氨基酸的重组穿梭质粒Bacmid-P9-1ΔC，用于在Sf9细胞中表达（图3-5）。



图3-5. P9-1与P9-1ΔC基因的RT-PCR产物检测

M, DNA Marker; 1, Product of the RT-PCR using P9-1 specific primer pairs; 1, Product of the

RT-PCR using P9-1ΔC specific primer pairs

#### **3.3.2.2** **P9-1**蛋白在**Sf9**细胞中形成类似于病毒原质的内含体

将重组穿梭质粒Bacmid-P9-1和Bacmid-P9-1ΔC分别转染Sf9细胞，经过两轮的侵染获得含高浓度重组杆状病毒的侵染液，用于侵染Sf9细胞。侵染后48 h的Sf9细胞用P9-1-FITC抗体进行免疫荧光标记，共聚焦显微镜下可观察到P9-1蛋白在Sf9细胞中形成分布于细胞质中的颗粒状聚集体（图3-6A），类似于呼肠孤病毒侵染寄主所形成的病毒原质。同时，免疫电镜切片也可以观察到P9-1的胶体金颗粒特异性地分布在细胞中类似于病毒原质的聚集体上（图3-6B），表明

SRBSDV编码的P9-1蛋白与RBSDV编码的P9-1蛋白以及MRCV编码的P9蛋白具有相似的功能，可以通过自身互作形成类似于病毒原质的聚集体。为了进一步明确SRBSDV的P9-1蛋白形成聚集体的功能，将SRBSDV的P9-1蛋白缺失

C端的20个氨基酸，并在Sf9细胞中表达P9-1ΔC蛋白，共聚焦显微镜观察到P9-1ΔC蛋白均匀地分布在细胞质中，不能形成聚集体（图3-6C）。表明P9-1蛋白是通过自身互作形成聚集体，且C端的20个氨基酸与P9-1蛋白形成颗粒状聚集体有关。



图3-6. P9-1蛋白在Sf9细胞中的定位

Fig. 3-6. Subcellular localization of P9-1 of SRBSDV in recombinant baculovirus-infected Sf9 cells. (A) Immunofluorescence staining of P9-1-FITC revealed punctate inclusions of P9-1 of SRBSDV in Sf9 cells. Bar, 5μm. (B) Immunogold labeling of P9-1 associated with electron-dense inclusion. Bar, 100 nm. (C) Immunofluorescence staining with P9-1-FITC revealed that a P9-1 mutant in which the C-terminal 20 residues had been deleted (P9-1ΔC) was diffusely distributed in the cytoplasm in Sf9 cells. Bar, 5μm.

### **3.3.3** **P9-1**蛋白在白背飞虱培养细胞中的表达

#### **3.3.3.1** **P9-1**蛋白在白背飞虱培养细胞中形成颗粒状内含体

用提取的SRBSDV粗提液侵染培养在coverglass上的白背飞虱培养细胞 2

d，然后用P9-1-rhodamine和P10-FITC抗体进行免疫荧光标记，共聚焦显微镜下可观察到P9-1-rhodamine标记在SRBSDV侵染细胞后形成的颗粒状内含体上（图3-7A），表明SRBSDV 侵染细胞后形成的颗粒状内含体即P9-1 蛋白。同时，

SRBSDV 的外壳蛋白P10-FITC 抗体也标记在颗粒状内含体上（图3-7B）。P10抗体标记的内含体与P9-1标记的内含体大部分发生共定位，但也存在仅标记P10抗体的内含体（图3-7C红色箭头所指）。由于P10蛋白是病毒粒体的外壳蛋白，

P10蛋白的分布代表着病毒粒体的分布，因此推测P9-1形成的颗粒状内含体即病毒复制的场所。



图3-7. P9-1和P10蛋白在SRBSDV侵染的白背飞虱培养细胞中的定位

Fig. 3-7. Subcellular localization of P9-1 and P10 of SRBSDV in virus-infected VCMs of WBPHs.

(A) Immunostaining with P10-FITC; (B) Immunostaining with P9-1-rhodamine. (C) Merged images of A and B. White arrow indicated the colocalization of P9-1 and P10. Red arrow indicate

Additional sites with P10. Bar, 10μm.

#### **3.3.3.2** **P9-1**蛋白形成的内含体是病毒**RNA**合成的场所

为了检测P9-1蛋白形成的内含体是否是病毒RNA合成的场所，用提取的

SRBSDV粗提液侵染培养在coverglass上的白背飞虱培养细胞2 d，随后用actinomycin D终止寄主细胞的复制和转录，然后用BrUTP处理培养细胞40min，最后用BrdU-FITC抗体标记细胞中新合成的病毒RNA，同时以P9-1-rhodamine标记P9-1蛋白形成的内含体。在共聚焦显微镜下观察到BrUTP标记的RNA分布在颗粒状的内含体中，与P9-1蛋白发生共定位（图3-8）。以上结果进一步表明P9-1形成的内含体是病毒RNA复制的场所。



图3-8. SRBSDV在培养细胞中合成RNA的位点

Fig. 3-8. Intracellular sites of RNA synthesis in SRBSDV-infected VCMs. (A) BrUTP-labeled viral RNA was stained with anti-BrdU from mouse, followed by anti-mouse IgG conjugated to FITC (green). (B) P9-1 protein is stained with P9-1-rhodamine (red). (C) Colocalization of

P9-1-rhodamine and BrUTP-labeled SRBSDV RNA is indicated in yellow (arrows). Bar, 10μm.

#### **3.3.3.3** **P9-1**蛋白形成的病毒原质是病毒装配的场所

已知病毒的外壳蛋白可以与P9-1形成的内含体发生共定位，因此推测P9-1形成的内含体可能是病毒装配的场所。为了证明以上的推测，对SRBSDV侵染2 d的白背飞虱培养细胞进行电镜切片和免疫电镜观察。电镜切片中可以观察到

电子致密体（病毒原质）中分布着病毒粒体（图3-9A），免疫电镜切片中可以观察到P9-1抗体特异性地与电子致密体结合（图3-9B），同时观察到P10抗体特异性地与电子致密体中的病毒粒体结合（图3-9C）。以上结果充分证明了病毒侵染的培养细胞中的电子致密体即病毒的复制场所病毒原质，P9-1 蛋白是病毒原质基质的组分；病毒侵染过程中，病毒粒体在P9-1形成的病毒原质中进行装配。



图3-9 电镜观察P9-1和P10蛋白在SRBSDV侵染的培养细胞中的定位

Fig. 3-9. Subcellular localization of P9-1 and P10 of SRBSDV in virus-infected VCMs by electron micrograph. (A) Electron micrograph of viroplasm in virus-infected VCMs. Arrows show viral particles in the matrix of viroplasm. (B) Immunogold labeling of P9-1 in the matrix of viroplasm.

(C) Immunogold labeling of P10 with the viral particles (arrows) within the matrix of viroplasm. Bars, 250 nm.

#### **3.3.3.4** **P9-1**蛋白形成的病毒原质在培养细胞中的成熟过程

在病毒侵染过程中，分别对侵染36、60、84 h的培养细胞进行免疫荧光标记。病毒侵染后36 h，在共聚焦显微镜下观察到P9-1蛋白在细胞内形成比较分散的小点状内含体（图3-10A）；侵染后60 h, P9-1蛋白早期形成的病毒原质发生了再聚集，形成较大的颗粒状内含体（图3-10B）；侵染后84 h，细胞内的颗粒状病毒原质再聚集形成块状的内含体（图3-10C）。这些结果表明由P9-1蛋白形成的病毒原质随着侵染时间的延长而逐渐发生聚集，意味着病毒原质的形成存在着逐渐成熟的过程。



图3-10. SRBSDV侵染培养细胞后不同时间形成的病毒原质形态Fig. 3-10. The morphology of the viroplasm induced by SRBSDV

A-C, The morphology of the viroplasm induced by SRBSDV infection at 36, 60 and 84 h post-inoculation, respectively. Bars, 10μm.

#### **3.3.3.5** **P9-1**蛋白在白背飞虱中肠表面的定位

白背飞虱饲毒后6 d，解剖其消化系统并进行免疫荧光标记，共聚焦显微镜下观察到中肠表面的肌肉组织上分布着大量由P9-1蛋白形成的病毒原质，P9-1分布在环肌和纵肌形成的肌肉簇间（图3-11A）。同时通过免疫电镜也观察到在中肠表面的肌肉簇间分布着大量的病毒原质（图3-11B）。表明SRBSDV在白背飞虱中肠表面的肌肉簇形成病毒原质并进行复制。



图3-11. P9-1蛋白在中肠表面肌肉组织的定位

Fig. 3-11. P9-1 protein localized along actin-based muscle fibers that surround the midgut in viruliferous WBPHs. A, Confocal micrograph showing the localization of P9-1 on visceral muscle tissues of midgut. Bar, 70µm. B, electron micrograph showing the localization of viroplasm on visceral muscle tissues of midgut; vm, visceral muscle; me, midgut epithelium; bl, basal lamina.

Bar, 250 nm.

### **3.3.4** **dsP9-1**对病毒在培养细胞中复制的影响

#### **3.3.4.1** **dsRNA**的合成

参照T7 RiboMAX Express RNAi System kit的操作方法体外合成源于SRBSDV P9-1基因和GFP基因的dsRNA。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明所合成的dsRNA大小与目的dsRNA大小相符，且条带单一（图3-12），紫外风光光度计测定浓度后用于RNA干扰试验。



图3-12 人工合成dsRNA的检测

Fig. 3-12. Detection of synthesized dsRNA

M, DNA marker; lane 1, dsRNA of P9-1; lane 2, dsRNA of GFP

#### **3.3.4.2** **dsP9-1**抑制病毒在培养细胞中的复制

为了进一步明确P9-1蛋白在病毒复制过程中的功能，本研究利用dsRNA诱导的RNAi技术在白背飞虱培养细胞中验证P9-1蛋白的功能。首先取3片培养白背飞虱培养细胞的coverglass，分别用dsP9-1、dsGFP和cellfection处理12 h，以cellfection的处理为对照。接着用病毒粗提液侵染白背飞虱培养细胞2 h，病毒侵染后2 d的培养细胞用于免疫荧光标记检测。共聚焦显微镜下观察到dsGFP处理与cellfection处理均没有抑制P9-1蛋白在培养细胞中形成病毒原质以及病毒粒体的装配，病毒可以正常侵染培养细胞（图3-13A, B）；而dsP9-1处理的培养细胞中病毒原质的形成和病毒粒体的装配几乎被完全抑制，仅有极少数的单细胞被病毒侵染（图3-13C）。



图3-13. dsP9-1抑制SRBSDV侵染培养细胞和形成病毒原质

Fig. 3-13. RNAi induced by dsP9-1 inhibited the infection of SRBSDV and the formation of viroplasm in VCMs. A, VCMs were transfected with Cellfectin transfection reagent; B, VCMs were transfected with dsGFP; C, VCMs were transfected with dsP9-1. Bars, 10μm.

### **3.3.5** **dsP9-1**对病毒在昆虫体内复制的影响

#### **3.3.5.1** 人工饲料的选择

为了引诱昆虫取食dsRNA，需要将dsRNA与人工饲料混合饲喂。由于不同物种的昆虫有不同的取食特性，因此根据已有的配方配置不同人工饲料饲喂白背飞虱若虫。通过观察饲喂1d后昆虫在Parafilm M封口膜上刺吸产生的痕迹判断其取食倾向，结果发现白背飞虱在添加D-97人工饲料的Parafilm M膜上刺吸产生的小泡最多，推断其最倾向于取食D-97人工饲料，其次分别为MMD-1、MED-1、MED-4和10%蔗糖，饲喂蒸馏水的处理昆虫几乎没有取食，因此选择D-97为合适的人工饲料。

#### **3.3.5.2** **dsRNA**的稳定性

将体外合成的源于GFP基因的dsRNA与选定的人工饲料D-97混合，在模拟饲喂条件下放置0、6、12、24 h后通过琼脂糖凝胶电泳检测dsRNA的稳定性。电泳结果表明dsRNA在人工饲料中放置24 h仍然保持较好的完整性，没有被降

解（图3-14），因此选择dsRNA混合液饲喂昆虫的时间为24 h。



图3-14 dsRNA在人工饲料中的稳定性

Fig. 3-14. dsRNA stability on incubation with artificial diet for different times

#### **3.3.5.3** **dsRNA**的饲喂浓度

为了获得dsRNA的合适饲喂浓度，本实验通过检测不同浓度dsRNA对白背飞虱体内Actin蛋白的干扰效果来确定饲喂浓度。首先通过同源克隆的方法获得白背飞虱*Actin* 基因片段及其序列，然后以此序列为基础合成*Actin* 基因的

dsRNA。以膜饲喂的方式将不同浓度的dsRNA饲喂1-2龄白背飞虱若虫1 d，然后通过实时荧光定量PCR对饲喂不同浓度dsRNA处理组的白背飞虱*Actin*基因表达量进行检测。实验结果显示，饲喂0.3µg/µl dsGFP和0.05µg/µl dsActin处理组的*Actin*基因表达量与饲喂人工饲料的对照组没有显著性差异；饲喂浓度为

0.1µg/µl、0.2µg/µl、0.3µg/µl、0.5µg/µl和1µg/µl处理组的*Actin*基因表达量分别是对照组的75%、55%、49%、27%和22%，均与对照组存在显著差异，其中0.2µg/µl与0.3µg/µl的处理组没有显著差异，0.5µg/µl与1µg/µl的处理组没有显著差异（图3-15）。以上结果表明，饲喂dsActin可显著抑制Actin基因在白背飞虱体内的表达。结合实验成本和干扰效果，选择0.5µg/µl的dsRNA浓度为最适浓度。



图3-15. 不同浓度dsRNA处理条件下*Actin*基因的表达量

Fig. 3-15. Knockdown of *Actin* expression by ingestion of different concentration dsRNA. The letters on the columns refer to the difference significance at the 0.01 level;

CK, artificial diet; GFP, 0.3µg/µl dsGFP

#### **3.3.5.4** 饲喂**dsP9-1**抑制**SRBSDV**侵染白背飞虱

前面的研究已表明dsP9-1在培养细胞中可以抑制病毒侵染及复制，为了验

证P9-1蛋白在昆虫体内的作用，本实验通过膜饲喂的方法分别将源于P9-1基因的dsP9-1、源于GFP基因的dsGFP和单独的人工饲料饲喂1-2龄的白背飞虱若虫1 d，接着在SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻上饲养。病毒在昆虫体内渡过12 d的循回期后，每个处理组抓取100头虫子并单独提取每头虫子的总RNA，通过RT-PCR检测白背飞虱的带毒率。PCR检测结果如表3-2所示：饲喂dsGFP的白背飞虱带毒率与单独饲喂人工饲料的带毒率均为86%以上，而饲喂dsP9-1的白背飞虱带毒率仅为11%，显著低于对照处理。以上结果表明饲喂源于P9-1基因的dsP9-1能够显著地抑制SRBSDV侵染白背飞虱。

表3-2 dsP9-1抑制SRBSDV在白背飞虱体内的侵染

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Treatment a | No. of insects giving positive results (n=100) | | |
| 1 | 2 | 3 |
| dsP9-1 | 11 | 10 | 12 |
| dsGFP | 86 | 86 | 89 |
| CK | 88 | 92 | 90 |

Table 3-2. RNAi induced by dsP9-1 strongly inhibited infection by SRBSDV in the body of WBPHs

a：每个处理抓取100头白背飞虱，通过RT-PCR扩增SRBSDV的P10基因，检测昆虫的带毒率

#### **3.3.5.5** **dsP9-1**干扰病毒在白背飞虱消化系统的复制和扩散

为了验证P9-1蛋白在昆虫体内是否也抑制病毒的复制，本研究通过膜饲喂法分别用混合人工饲料的dsP9-1、dsGFP和单独的人工饲料饲喂1-2龄的无毒白背飞虱若虫1 d，接着在SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻上饲养。饲毒后2、6、12 d分别抓取50头虫子用于观察病毒在昆虫消化系统中的复制情况。实验中分别用P10-FITC、P9-1-rhodamine和phalloidin-Alexa Fluor

647标记病毒的P10蛋白、P9-1蛋白和昆虫的肌动蛋白Actin。饲毒后2 d，约

84%饲喂dsGFP的白背飞虱的少数中肠上皮细胞中可观察到P9-1和P10蛋白，而仅有12%饲喂dsP9-1的白背飞虱的少数上皮细胞中可观察到P9-1和P10蛋白

（图3-16A），表明dsP9-1特异性干扰了P9-1蛋白的表达并显著地抑制了病毒在中肠上皮细胞的初侵染。饲毒后6 d，在83%饲喂dsGFP的白背飞虱体内可以观察到P9-1和P10蛋白广泛分布在中肠上皮细胞内，而仅有6%饲喂dsP9-1的白背飞虱体内可观察到P9-1和P10蛋白发生扩散，且仍有12%的白背飞虱体内P9-1和P10蛋白仍被限制在初侵染的上皮细胞内（图3-16B），表明dsP9-1诱导的RNAi抑制了病毒从中肠上皮细胞向周围扩散。饲毒后12 d，88%饲喂dsGFP的白背飞虱体内病毒广泛分布于中肠和唾液腺，然而仅有13%饲喂dsP9-1的白背飞虱体内病毒仍然仅分布在中肠，在唾液腺内未观察到P9-1和P10蛋白（图3-16C）。只饲喂人工饲料的白背飞虱体内病毒的复制情况与饲喂dsGFP的情况相同。以上结果表明干扰病毒原质组分P9-1蛋白的表达可以抑制病毒在昆虫体内的复制以及延缓病毒的扩散，从而进一步证明P9-1蛋白参与病毒的复制，是病毒复制

的关键因子。

表3-3 dsP9-1对P9-1和P10蛋白在白背飞虱消化系统分布的影响

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Percentages of SRBSDV-infected insects | | | | | | | | |
| Tissue a | 2 days | | 6 days | | | 12 days | | |
|  | dsP9-1 | dsGFP |  | dsP9-1 | dsGFP |  | dsP9-1 | dsGFP |
| Limited area of midgut | 12 | 84 |  | 12 | 4 |  | 8 | 0 |
| Extensive area of midgut | 0 | 0 |  | 6 | 83 |  | 13 | 88 |
| Salivary gland | 0 | 0 |  | 0 | 20 |  | 0 | 78 |

Table 3-3. Percentages of P9-1 and P10 antigens in digestive system of WBPHs after ingestion of dsP9-1 or dsGFP and acquisition feeding on virus-infected plants

a：每个处理解剖50头白背飞虱，使用P9-1-rhodamine和P10-FITC抗体同时进行标记检测病毒在昆虫消化系统的分布



图3-16 饲喂dsP9-1抑制病毒在白背飞虱消化系统的复制和扩散

Fig. 3-16. Ingestion of dsP9-1 suppressed viral replication and spread in digestive system of

WBPHs. At 2 days (A), 6 days (B) and 12 days (C) post-first access to diseased plants, internal organs of WBPHs receiving dsP9-1 or dsGFP were stained for SRBSDV virions with P10-FITC (green), stained for viroplasm with P9-1–rhodamine (red), and stained for actin with actin dye phalloidin-Alexa Fluor 647 carboxylic acid (blue). mg, midgut; sg, salivary gland. Bars, 70μm.

### **3.3.6** 饲喂**dsP9-1**阻碍白背飞虱传播**SRBSDV**

无毒白背飞虱饲喂人工合成的dsP9-1、dsGFP或单独的人工饲料后饲毒2 d，随后转到健康水稻上饲养10 d，然后以单管单虫单苗传毒，传毒后的水稻幼苗在防虫条件下生长一个月后观察其发病情况。统计结果表明饲喂dsGFP的白背飞虱与单独饲喂人工饲料的白背飞虱带毒率和传毒率相近，带毒率和传毒率分别为85%和60%，而饲喂dsP9-1的白背飞虱带毒率为12%，传毒率为零（表3-4），表明饲喂dsP9-1阻碍了SRBSDV在白背飞虱体内的侵染并抑制了白背飞虱的传毒能力。

表3-4. 饲喂dsP9-1抑制白背飞虱传播SRBSDV

Table 3-4. Ingestion of dsP9-1 inhibited the transmission of SRBSDV by WBPH

| No. of insects giving positive results ( n= 50) | | | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Treatment a | Experiment 1 | | Experiment 2 | | | Experiment 3 | | |
|  | Positive | Transmitted |  | Positive | Transmitted |  | Positive | Transmitted |
| dsP9-1 | 6 | 0 |  | 7 | 0 |  | 6 | 0 |
| dsGFP | 44 | 32 |  | 40 | 28 |  | 43 | 30 |
| CK | 45 | 31 |  | 43 | 30 |  | 46 | 33 |

a：每个处理取50头白背飞虱进行传毒，RT-PCR检测昆虫带毒率，重复3 次

## **3.4** 讨论

SRBSDV与RBSDV的亲缘关系相近，同属于呼肠孤病毒科斐济病毒属，然而却有着不同的传播介体。SRBSDV编码的P9-1蛋白与RBSDV编码的P9-1蛋白氨基酸存在77%的同源性，而RBSDV编码的P9-1蛋白是形成病毒原质的组分（Akita *et al*., 2012），因此推测SRBSDV编码的P9-1蛋白可能也具有同样的功能。本章研究内容从多个方面证明了SRBSDV编码的P9-1蛋白是病毒原质的组分，与病毒的复制有关。

呼肠孤病毒在寄主内复制的显著特征是需要由病毒编码蛋白形成的复制场所——病毒原质。病毒原质是存在于寄主细胞质中的颗粒状内含体，病毒在病毒原质中完成病毒基因组的复制和病毒粒体的装配。我们的研究首先证明了

SRBSDV编码的P9-1蛋白可以在非寄主细胞Sf9中独立形成类似于病毒原质的聚集体，且P9-1蛋白C端的氨基酸是P9-1自身互作形成聚集体的关键位点，该研究中形成的病毒原质与RBSDV 和MRCV 形成的病毒原质具有相似的特征

（Akita *et al*., 2012; Maroniche *et al*., 2010）；其次，通过免疫荧光标记和电子显微镜技术证明P9-1蛋白是病毒原质的组分，且病毒在P9-1形成的病毒原质中合成

病毒RNA和组装病毒粒体，证实了关于病毒原质是呼肠孤病毒复制和装配场所的假说。P9-1蛋白在Sf9细胞中可以自身互作形成聚集体，而在SRBSDV侵染白背飞虱培养细胞的不同时间段所形成的病毒原质也存在由小到大的变化，表明P9-1蛋白形成的病毒原质不断地聚集，最终才形成成熟的病毒原质。与SRBSDV同属于呼肠孤病毒科但不同属的水稻矮缩病毒Pns12形成的病毒原质也存在类似的现象，Pns12形成的病毒原质颗粒由小变大，同时数量逐渐减少（Wei *et al*., 2006b）。

P9-1蛋白是SRBSDV形成病毒原质基质的组分，但并不是唯一的组分。最新的研究发现SRBSDV编码的P5-1和P6蛋白均能标记在病毒原质中，推测这两个蛋白也与病毒的复制有关。病毒原质由多个蛋白参与形成的现象在RDV 和

RGDV中均有发现，RDV编码的Pns6、Pns11和Pns12参与病毒原质的形成，

RGDV编码的Pns7、Pns9和Pns12参与病毒原质的形成（Wei *et al*., 2006b; Akita *et al*., 2011）。因此还需进一步验证SRBSDV编码的P5-1和P6蛋白的功能，明确其在病毒原质形成和病毒复制过程中的作用，完善对SRBSDV复制机理的认识。

呼肠孤病毒科病毒的基因组一般由10-12条dsRNA组成，由于基因组的复杂性，目前还没有成功的侵染性克隆可用于病毒基因功能的研究，因此严重制约着对呼肠孤病毒基因功能的深入研究。自1998年dsRNA诱导的RNAi技术首次在线虫中应用（Fire *et al*., 1998），目前该技术已被扩展应用到植物、动物和微生物等领域的基因功能研究，并作为一种新的农业病虫害防治手段。RNAi技术弥补了缺乏反向遗传学手段的缺点，可以干扰目的蛋白的表达并造成基因功能缺失。昆虫培养细胞是研究虫传病毒的理想实验平台，其有利于控制病毒的侵染量和选择不同的侵染条件，还有利于通过免疫荧光标记和电镜切片观察病毒在细胞中的侵染过程，而且具有可重复性。因此本研究将dsRNA诱导的RNAi技术与昆虫培养细胞技术有机结合，在白背飞虱培养细胞中证实了干扰P9-1蛋白的表达直接影响病毒在细胞内病毒原质的形成，从而抑制了病毒在细胞中的复制；证明了P9-1蛋白是SRBSDV形成病毒原质和病毒复制所必需的。本研究为植物病毒的蛋白功能研究开辟了新的研究方法。

RNAi技术不仅可以在细胞水平使用，也可以在昆虫个体水平使用。自1998年Fire 等首次通过注射法将dsRNA导入线虫中（Fire *et al*., 1998），科学家已探索出多种方式将外源dsRNA导入昆虫体内，如注射法（Amdam *et al*.,2003; Mutti *et al*., 2006; Tang *et al*., 2010）、饲喂法（Dong *et al*., 2011; Li *et al*., 2011）、浸泡法

（Zhu *et al*., 2010）、转基因植物表达后昆虫取食等（Price and Gatehouse, 2008; Zha *et al*., 2011; Upadhyay *et al*., 2011）。但针对不同物种的昆虫所适用的方法不同。白背飞虱作为刺吸式口器的昆虫，通过膜饲喂法饲喂dsRNA不仅操作简单

方便，而且昆虫的死亡率低，还可以保证昆虫的完整性（Li *et al*., 2011）。然而膜饲喂法也存在一些缺点，如dsRNA的利用率低，昆虫的摄入量无法测定。本研究饲喂源于白背飞虱*Actin*基因的dsRNA 1 d即可检测到目的基因的表达受到抑制，表明白背飞虱体内存在着RNAi的免疫机制，而且是高效的免疫机制。Xu等通过比较分析SRBSDV侵染的白背飞虱与健康白背飞虱的EST序列差异性，明确SRBSDV侵染白背飞虱能激活昆虫体内的免疫调控系统，如RNAi、自我吞噬和抗菌肽生成等（Xu *et al*., 2012）。这为我们设想通过干扰控制白背飞虱生长发育基因的表达从而防治白背飞虱大面积发生的策略奠定了理论基础。

昆虫体内的RNAi机制不仅可以用于干扰介体昆虫自身蛋白的表达，还可以用于干扰病毒编码蛋白的表达。本研究通过饲喂人工合成的源于SRBSDV P9-1基因的dsRNA，成功地干扰了P9-1蛋白在昆虫体内的表达，并抑制了SRBSDV的侵染，显著地降低白背飞虱的带毒率，以及延缓或阻碍病毒在昆虫体内的扩散。其根本原因是SRBSDV编码的P9-1蛋白是病毒原质基质的组分，是病毒复制和装配的场所，干扰P9-1蛋白的表达则阻碍病毒原质的形成，病毒即无法进行复制，从而导致由肠腔侵入中肠上皮细胞的病毒粒体在上皮细胞中不能有效复制，最终导致白背飞虱带毒率显著下降。其次，前期能够成功侵入中肠上皮细胞并进行复制的病毒，在后期的复制过程中也受到了RNAi的抑制，在一定程度上阻碍了病毒的复制和装配，使得病毒量不足，从而延缓或阻碍了病毒在白背飞虱体内的扩散。

昆虫体内的RNAi机制已被用于病毒的防治。例如通过饲喂源于中华蜜蜂囊状幼虫病毒（*Chinese sacbrood virus*, CSBV）基因的dsRNA可以防止幼蜂感染CSBV （Liu *et al*., 2010）；应用RNAi原理获得的表达RBSDV P9-1基因dsRNA的转基因水稻可以有效地抑制RBSDV侵染水稻（Shimizu *et al*., 2011）。本研究饲喂人工合成的源于SRBSDV P9-1基因的dsRNA显著地抑制了SRBSDV在白背飞虱体内的侵染和复制，由于病毒的复制被抑制导致病毒量下降，从而抑制了病毒在昆虫体内的扩散而无法到达唾液腺，最终导致白背飞虱无法传播

SRBSDV。该研究结果不仅证明了P9-1蛋白在病毒复制过程中的重要作用，而且表明P9-1基因可作为病害防治的理想靶标基因，为利用转基因技术表达病毒基因dsRNA以提高水稻抗SRBSDV侵染的能力提供了理论依据。

# **4.** **P7-1**蛋白参与**SRBSDV**的扩散

持久增殖型病毒必须由介体昆虫传播才能侵染新的寄主植物，且其在介体昆虫体内必须进行增殖和扩散才能到达唾液腺，然后在昆虫取食时才能随着唾液传播到健康的寄主植物。病毒必须突破重重屏障才能完成在介体昆虫体内的扩散，通常病毒随着植物汁液进入昆虫的肠腔，再从肠腔侵入中肠上皮细胞，然后从中肠上皮细胞到中肠外表和消化系统其他器官，最后到达唾液腺。因此病毒在介体昆虫体内的扩散也是介体能否有效传播病毒的关键因素，研究病毒在昆虫体内的扩散机理将有利于进一步理解病毒的传播方式，为阻断病毒的传播提供理论依据。

在侵染植物的呼肠孤病毒中，已有的研究发现RDV和RBSDV侵染介体或寄主后可在侵染细胞内形成包裹病毒粒体的管状结构（Wei *et al*., 2006a; Isogai *et al*., 1998），并且已明确RDV编码的Pns10蛋白是形成小管结构的蛋白，并参与病毒的扩散（Chen *et al*., 2012）。研究发现RGDV的病毒粒体在培养细胞中聚集排列在微管上，病毒粒体与微管的结合参与病毒粒体的释放（Wei *et al*., 2009）。由于SRBSDV属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）斐济病毒属（*Fijivirus*）的一个暂定种（周国辉等，2008），因此推测SRBSDV可能具有类似于RDV的扩散方式。目前的研究已知SRBSDV编码的非结构蛋白P7-1能在昆虫细胞Sf9中独立诱导形成伸出细胞膜的直径约为85 nm的小管结构，且通过酵母双杂交证明P7-1蛋白可以自身互作，表明P7-1具有在非寄主细胞内独立装配形成小管结构的能力（Liu *et al*., 2011）。此外，SRBSDV编码的非结构蛋白P7-1与RBSDV编码的P7-1蛋白氨基酸具有80%的同源性，而RBSDV编码的P7-1蛋白可以标记在包裹病毒粒体的管状结构上（Isogai *et al*., 1998）。因此推测SRBSDV编码的P7-1蛋白在寄主内也能形成小管结构，可能参与病毒的扩散。

本章节首先制备了P7-1蛋白的抗体，用于后续基因功能的研究；其次，通过免疫荧光标记和免疫电镜技术在白背飞虱培养细胞和昆虫体内鉴定P7-1蛋白形成管状结构以及管状结构在昆虫体内扩散的模式；最后通过RNAi技术进一步明确P7-1蛋白参与病毒扩散的功能，从而明确SRBSDV在白背飞虱体内的扩散机理。

## **4.1** 材料与试剂

### **4.1.1** 毒源和虫源

感染SRBSDV的水稻病株采自湖南省芷江市，采回后种植在实验室田间水

稻病毒圃。介体白背飞虱采自福建农林大学水稻田，并于25℃条件下饲养在水稻幼苗上。成虫期的白背飞虱在水稻幼苗上产卵3 d，产卵后10-12 d孵出1 龄

若虫，生长到2龄的若虫用于实验。

### **4.1.2** 菌株、载体和昆虫培养细胞

大肠杆菌DH5为本实验室保存，大肠杆菌DH10Bac由北京大学李毅教授惠赠。Gateway表达系统的pDONR221和pDEST17载体均购自Invitrogen公司。白背飞虱培养细胞由本实验室培养保存。

### **4.1.3** 试剂与抗体

M-MuLV反转录酶和RNA酶抑制剂购自Promega公司；Phusion DNA聚合酶购自NEB公司；SFM900Ⅱ与FBS购自GIBCO公司；纤维素粉CF-11、BCIP/NBT、protein A Agarose均购自Sigma公司；Gateway BP Clonase Enzyme Mix、Gateway LR Clonase Enzyme Mix、Trizol、二甲基甲酰胺（DMF）、荧光素粉、荧光抗衰减液、phalloidin- rhodamine、Goat anti-rabbit IgG-AP和Cellfectin II购自Invitrogen公司；DIG northern starter kit购自Roche公司；Protein A IgG purification kits购自

Thermo公司；T7 RiboMAX™Express RNAi System kits、GoTaq qPCR Master Mix购自Promega公司；戊二醛、醋酸双氧铀和柠檬酸铅购自Alfa Aesar公司；LR gold包埋剂购自London Resin公司；Goat anti-Rabbit IgG-15 nm胶体金购自British BioCell International公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

## **4.2** 实验方法

### **4.2.1** 抗体制备

#### **4.2.1.1** 引物设计

根据SRBSDV的S7片段基因序列（GenBank: HM585273.1）设计扩增P7-1基因完整开放阅读框的引物P7-1F/R，基因序列为正体，引物5'端的gateway重组序列为斜体（表4-1）。

#### **4.2.1.2** 构建**P7-1**原核表达载体

以3.2.1.2提取的SRBSDV的dsRNA为模板，P7-1R为引物进行反转录获得单链cDNA，然后以此cDNA为模板，用P7-1F/R引物进行PCR, PCR产物经

1%的琼脂糖凝胶电泳检测，然后将扩增到的目的条带割胶回收，使用天根公司的DNA凝胶回收试剂盒纯化目的基因片段。

参照3.2.1.3方法将P7-1基因片段与gateway入门载体pDONOR221进行BP重组反应。将获得的入门载体pDONOR221-P7-1与表达载体pDEST17进行LR重组反应获得表达载体pDEST17-P7-1.

#### **4.2.1.3** 原核表达**P7-1**蛋白

参照3.2.1.4方法将构建好的表达载体pDEST17-P7-1转入大肠杆菌Rocceta

菌株，通过IPTG诱导表达P7-1蛋白，然后通过SDS-PAGE凝胶电泳检测。

#### **4.2.1.4** **P7-1**抗体的制备、检测与交联

参照3.2.1.5方法通过静脉注射新西兰大白兔法制备抗体，注射5次后动脉

取血收集抗血清。以3.2.1.6提取的水稻病株总蛋白为抗原，健康水稻总蛋白为阴性对照，制备的P7-1蛋白抗血清为一抗进行Western blot实验，检测所制备抗体的特异性。检测后的抗血清参照2.2.1和2.2.2方法进行提纯和交联，提纯的P7-1蛋白IgG分别与FITC和rhodamine交联，得到P7-1-FITC和P7-1-rhodamine抗体。

### **4.2.2** **P7-1**蛋白在白背飞虱培养细胞中的定位

#### **4.2.2.1** 免疫荧光标记**P7-1**蛋白

将SRBSDV粗提液按照3.2.3.3的方法侵染培养在coverglass上的白背飞虱培养细胞。病毒侵染2 d后，参照3.2.2.3方法用P7-1-FITC抗体标记病毒在培养细胞中表达的P7-1蛋白，共聚焦显微镜观察荧光。

#### **4.2.2.2** 电镜观察**P7-1**蛋白

参照3.2.3.4方法将病毒侵染后2 d的培养细胞进行常规电镜切片和免疫电镜切片处理，电子显微镜下观察P7-1蛋白在培养细胞中的结构和特征。

#### **4.2.2.3** 中和抗体检测**P7-1**在病毒扩散中的作用

病毒在培养细胞中复制增殖后，可产生游离的病毒粒体并释放到细胞外侵染健康细胞。通过加入病毒抗体可以封闭游离的病毒粒体，从而阻止其对健康细胞的侵染。为了明确P7-1蛋白形成的包裹病毒粒体的小管是否具有胞间扩散病毒的功能，在病毒侵染细胞后，向培养基中加入病毒抗体，检测病毒的侵染扩散情况。具体操作方法为：

##### （1) 首先将白背飞虱培养细胞培养在两片coverglass上，25℃培养箱中生长4 d；

##### （2) 待生长的单层培养细胞覆盖coverglass的80%以上后，吸除coverglass

上的培养基，并用His-Mg溶液清洗两次；

##### （3) 向清洗后的coverglass上加入100µl SRBSDV粗提液，室温静置2 h；

##### （4) 吸除coverglass表面的病毒粗提液，并用His-Mg溶液清洗两次；

##### （5) 向一片coverglass上加入含10µg病毒抗体的培养基，另一片上加入培养基作为对照，将放置coverglass的培养皿封口后放入25℃恒温培养箱中培养。

(6)当细胞培养72 h后，将coverglass取出，按照3.2.2.3的免疫荧光标记方法用P9-1-FITC和P7-1-rhodamine抗体同时标记病毒在培养细胞中表达的P9-1和P7-1蛋白，共聚焦显微镜下观察荧光。

### **4.2.3** **dsP7-1**对病毒在培养细胞中扩散的影响

#### **4.2.3.1** **dsRNA**的合成

根据SRBSDV第7条链的基因序列（GenBank: HM585273.1）设计位于*P7-1*基因开放阅读框内部的dsRNA引物P7-1T7F/R，同时以绿色荧光蛋白*GFP*基因的序列（GenBank: AF324407.1）设计GFP基因的dsRNA引物GFPT7F/R，基因序列为正体，引物5' 端添加的T7 启动子序列为斜体（表4-1）。引物序列送深圳华大基因公司合成。参照3.2.4.1方法应用T7 RiboMAX™Express RNAi System试剂盒合成*P7-1*的dsRNA（dsP7-1）和*GFP*基因的dsRNA（dsGFP）。

#### **4.2.3.2** **dsP7-1**处理白背飞虱培养细胞

参照3.2.4.2方法用dsP7-1处理培养细胞6 h，同时用dsGFP或cellfection处理的培养细胞为对照，然后用SRBSDV粗提液侵染2 h。当细胞培养36、72 h后，将coverglass取出，按照3.2.2.3的免疫荧光标记方法使用P9-1-FITC和P7-1-rhodamine抗体同时标记病毒的P9-1和P7-1蛋白，共聚焦显微镜下观察荧光。

#### **4.2.3.3** **RT-qPCR**检测病毒蛋白的表达

取一瓶培养在细胞瓶中的白背飞虱培养细胞，参照3.2.4.2方法用dsP7-1处理培养细胞6 h，同时取一瓶培养细胞用cellfection处理作为对照，然后用SRBSDV粗提液侵染2 h。更换培养基培养72 h后，将细胞瓶中的细胞全部吹起并收集到15

ml 离心管中，用于提取培养细胞的总RNA及后续的RT-qPCR实验。

**1. Trizol法提取培养细胞总RNA**

将收集到的培养细胞于5000 rpm离心5 min，除去培养基，按照Trizol试剂说明书向离心管中加入500µl Trizol试剂，重悬培养细胞，室温静置10 min；4℃，12000 rpm离心15 min 后收集上清于1.5 ml离心管；加入100µl 的氯仿，涡旋混匀，室温静置10 min；4℃，12000 rpm离心10 min，收集上清于1.5 ml离心管；加入250µl的异丙醇，颠倒混匀，放置在摇床上缓慢摇动30 min，使RNA充分沉淀；4℃，12000 rpm离心10 min，除去上清，加入500µl 70%的乙醇洗涤沉淀1次；离心除去乙醇，超净台中干燥RNA沉淀后加入30µl DEPC水溶解RNA，-80℃保存备用。

**2. RT-qPCR**

根据SRBSDV的P7-1、P9-1和P10基因的序列分别设计实时荧光定量PCR

引物，同时以白背飞虱*Actin*基因序列为内参基因并设计实时荧光定量PCR引物

（见表4-1）。以提取的培养细胞总RNA为模板，用随机引物反转录获得cDNA。参照GoTaq qPCR Master Mix试剂盒（Promega公司，美国）操作说明配制反应体系，每个样品设3个重复，在Mastercycler realplex4实时定量PCR仪（Eppendorf, 德国）上检测P7-1、P9-1和P10基因的表达量。实验数据采用2-ΔΔ*C*T算法进行数据分析。

#### **4.2.3.4** **Western blot**检测病毒蛋白的表达

取一瓶培养在细胞瓶中的白背飞虱培养细胞，参照3.2.4.2方法用dsP7-1处理培养细胞6 h，同时取一瓶培养细胞用cellfection 处理作为对照，然后用

SRBSDV粗提液侵染2 h。更换培养基后培养72 h，将细胞瓶中的细胞全部吹起并收集到15 ml离心管中。参照3.2.1.6方法提取dsP7-1处理培养细胞和对照组细胞的总蛋白，然后进行Western blot检测P7-1、9-1和P10蛋白的表达量。

### **4.2.4** **P7-1**蛋白在白背飞虱消化系统的扩散途径

将1-2龄的无毒白背飞虱若虫参照2.2.3的方法进行饲毒，在饲毒后的1、3、

5、6、9、12 d参照2.2.4方法解剖白背飞虱消化系统，通过免疫荧光标记法标记

P7-1蛋白在白背飞虱消化系统的扩散途径。

### **4.2.5** 验证**P7-1**与白背飞虱**Actin**的互作

由于P7-1蛋白形成的管状结构沿着中肠表面的肌肉组织扩散，因此推测P7-1蛋白与组成肌肉组织的Actin之间存在着互作关系。为此本节将通过酵母双杂交和免疫共沉淀的方法验证P7-1与Actin之间的互作。

#### **4.2.5.1** 酵母双杂交验证**P7-1**与**Actin**的互作

**1. 构建酵母双杂交载体**

根据SRBSDV的第7条链基因序列设计扩增P7-1基因完整开放阅读框的引物P7-1BF/BR，以白背飞虱*Actin*基因序列设计扩增*Actin*基因完整开放阅读框的引物ActinPF/PR，基因序列为正体，引物5'端的酶切位点序列为斜体（见表4-1）。通过酶切连接法将PCR 扩增获得的*P7-1* 和*Actin* 基因片段分别连接到pBT3-STE和pPR3-N载体，得到诱饵载体pBT3-STE-P7-1和文库载体pPR3-N-Actin。

**2. 酵母双杂交验证蛋白互作**

(1)挑取在YPAD固体培养基上划线培养的NMY51酵母单菌落到YPAD液体培养基，30℃震荡培养8 h；

##### （2) 将培养的酵母菌转接到装有50 ml YPAD的三角瓶中，30℃震荡培养8 h；

(3)待酵母菌的OD546为0.6-0.8时，2500 g离心5 min，除去上清；

(4)向沉淀中加入1.5 ml灭菌水重悬酵母菌，即为制备的酵母感受态；

(5)按下列比例配制PEG/LiOAc溶液：

50%PEG 2.4 ml

10×LiOAc 360µl

单链carrier DNA 200µl

(6)按下表配制质粒，每个质粒加7µl；

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 转化管编号 | 诱饵质粒 | 文库质粒 | 备注 |
| 1 | pBT3-STE-P7-1 | pPR3-N-Actin |  |
| 2 | pBT3-STE-P7-1 | pPR3-N |  |
| 3 | pTSU2-APP | pNubG-Fe65 | 阳性对照 |
| 4 | pTSU2-APP | pPR3-N | 阴性对照 |

(7)向每个管中加入300µl PEG/LiOAc溶液，涡旋混匀；

(8)向每个管中加入100µl 酵母菌感受态细胞，涡旋混匀；

(9) 42℃水浴锅中孵育45 min；

（10）700 g离心5 min，除去上清，并加入150µl 0.9%的氯化钠溶液重悬酵母菌；

（11）吸取50µl转化后的酵母菌涂布在SD-Leu-Trp固体培养基上，30℃培养

3-4 d；

##### （12）挑取二缺培养基上生长的单菌落到SD-Leu-Trp-His-Ade固体培养基上，

30℃培养3-4 d，同时将对应的单菌落挑到SD-Leu-Trp液体培养基中，震荡培养过夜；

（13）收集200µl震荡培养的酵母菌，5000 rpm离心5 min，除去上清；

（14）加入50µl X-α-gal显色液，悬浮酵母菌后置于37℃培养箱中反应1-2 h，观察菌体是否发生颜色反应即变蓝。

#### **4.2.5.2** 免疫共沉淀验证**P7-1**与**Actin**的互作

(1)配制10 ml的蛋白提取液（50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP-40）；

(2)收集饲毒后并渡过循回期的白背飞虱虫体0.5 g，以及健康的白背飞虱虫体0.5 g，用液氮充分研磨后，分别加入3 ml提取液继续研磨；

(3)研磨后的匀浆分别装入10 ml离心管，12000 rpm离心20 min，收集上清；

(4)向0.5 ml的蛋白提取液中加入10µl protein A Agarose，4℃摇床上孵育1h；

(5) 4℃，250 g离心5 min，收集上清液，向上清中加入20µl P7-1蛋白的IgG，

4℃摇床上孵育4 h；

(6)向蛋白上清中加入20µl protein A Agarose，4℃摇床上孵育1 h；

(7) 4℃，250 g离心5 min，收集沉淀；

(8)沉淀用洗涤液（含2mM DTT的提取液）洗3次，每次于250 g离心5 min，收集沉淀；

(9)向洗涤后的沉淀中加入50µl SDS Loading buffer，水浴锅中煮沸10 min；

（10）参照3.2.1.6方法进行Western blot检测P7-1和Actin蛋白。

### **4.2.6** **dsP7-1**对病毒在昆虫消化系统扩散的影响

#### **4.2.6.1** 膜饲喂法饲喂**dsP7-1**

按照3.2.5.1的方法将dsP7-1和dsGFP分别与人工饲料混合，然后添加到饲喂装置一端的双层Parafilm M膜中间，同时以单独饲喂人工饲料的为对照处理。1-2龄的无毒白背飞虱若虫取食1d后，将其分别转移到SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻幼苗上饲养，供RT-qPCR、Western blot和免疫荧光标记法检测dsP7-1对病毒在白背飞虱体内侵染的影响。

#### **4.2.6.2** **Western blot**分析**dsP7-1**对病毒蛋白在昆虫体内表达的影响

将4.2.6.1饲喂dsP7-1和dsGFP后并饲毒2 d的白背飞虱转到健康水稻上饲养10 d，每个处理分别抓取50头白背飞虱，参照3.2.1.6的方法提取各处理组白背飞虱的总蛋白，并应用Western blot分析P7-1、P9-1和P10蛋白的表达量，同时检测白背飞虱Actin的表达量作为参照。

#### **4.2.6.3** **RT-qPCR**检测**dsP7-1**对病毒在昆虫体内表达蛋白的影响

将4.2.6.1饲喂的白背飞虱在健康水稻上饲养10 d后，每个处理分别抓取50头白背飞虱，通过Trizol法提取各处理组白背飞虱的总RNA。参照GoTaq qPCR Master Mix试剂盒（Promega公司，美国）操作说明配制反应体系，每个样品设

3个重复。在Mastercycler realplex4实时定量PCR仪（Eppendorf, 德国）上以提取的白背飞虱总RNA为模板进行RT-qPCR分别检测P7-1、P9-1和P10基因的表达，同时以白背飞虱的Actin基因作为内参基因，实验数据采用2-ΔΔ*C*T算法进行数据分析。

#### **4.2.6.4** 免疫荧光标记检测**dsP7-1**对病毒在昆虫消化系统扩散的影响

为了明确饲喂源于P7-1基因的dsRNA对病毒在白背飞虱体内复制和扩散的影响，将4.2.6.1中饲喂dsP7-1和dsGFP处理的白背飞虱在饲毒后的1、3、5、6、

9、12 d分别抓50头，按照2.2.4和2.2.5的方法在显微镜下解剖获得每头虫子的消化系统器官，并使用P9-1-rhodamine和P10-FITC抗体同时标记消化系统器官，共聚焦显微镜下观察病毒在昆虫消化系统的扩散和复制情况。

#### **4.2.6.5** 饲喂**dsP7-1**对白背飞虱传毒率的影响

为了明确介体白背飞虱饲喂源于P7-1基因的dsRNA后对其传播病毒能力的影响，将1-2龄的无毒白背飞虱按照3.2.5.5方法饲喂分别dsP7-1、dsGFP以及单独的人工饲料1 d后，转移到SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻幼苗上饲养10 d，分别抓取50头白背飞虱以单管单虫单苗方式接种到无

病水稻幼苗上，每次接种2-3 d，接种后的水稻在防虫条件下种植。生长一个月后统计水稻的发病情况，计算白背飞虱的传毒率。

表4-1 本章中用到的引物

Table 4-1. Primers used in this study

| 引物（primer） | 引物序列（sequence） |
| --- | --- |
| P7-1F | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT  TCATGGATAGACCTGCTCGAGAAC 3' |
| P7-1R | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT  CAGATGATGGAGATTCAAAAACAGG 3' |
| P7-1T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATA  GGGTTGACAATTAGAAACGACCAACG 3' |
| P7-1T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGAGAAAAGTCGGACTTAATAACGC 3' |
| GFP-T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGATGAGTAAAGGAGAAGAACTT 3' |
| GFP-T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGTTATTTGTATAGTTCATCCATG 3' |
| P7-1BF | 5' ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGATAGACC  TGCTCGAGAACA 3' |
| P7-1BR | 5' AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCCAGATGATG  GAGATTCAAAAACAGG 3' |
| ActinPF | 5' ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTGTGACGA  CGATGTTGCC 3' |
| ActinPR | 5' AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCCTTAGAAGC  ACTTCCTGTGCACAAT 3' |
| qActinF | 5' GCCGTCTTTCTTGGGTATGG 3' |
| qActinR | 5' AGGGCGGTGATCTCCTTCTG 3' |
| qP7-1F | 5' AGCCAAGTTTGTCGCTGATG 3' |
| qP7-1R | 5' GCGTTATTCAATGGGTGTTCA 3' |
| qP9-1F | 5' ATGGCAGACCTAGAGCGTAGAA 3' |
| qP9-1R | 5' CCGTCGTCGAGTAGGGGA 3' |
| qP10F | 5' AACGAGTACAAATTGAGACCCTAAC 3' |
| qP10R | 5' TGAGCAGGAACTTCACGACAAC 3' |

## **4.3** 结果与分析

### **4.3.1** **P7-1**蛋白的抗体制备与检测

#### **4.3.1.1** **P7-1**蛋白表达载体的构建

以提取的SRBSDV的dsRNA为模板进行RT-PCR扩增*P7-1*基因的完整开放阅读框片段，琼脂糖凝胶电泳检测到大小约1136 bp的DNA片段（图4-1）。由于SRBSDV的开放阅读框为1074 bp，引物两端均含有31 bp的gateway重组序列，所以扩增的片段与目的基因大小一致。目的片段经BP重组反应构建到入门载体pDONOR221，测序后正确的质粒即pDONOR221-P7-1。将入门载体

pDONOR221-P7-1与表达载体pDEST17进行LR反应，获得重组后的表达载体

pDEST17-P7-1. PCR检测为阳性的质粒即可用于P7-1蛋白的表达。



图4-1 *P7-1*基因的RT-PCR产物

Fig. 4-1 RT-PCR product of*P7-1*

M, DNA Marker; 1-2, Product of the RT-PCR using P7-1 specific primer pairs

#### **4.3.1.2** **P7-1**蛋白的诱导表达

将原核表达载体pDEST17-P7-1转化到大肠杆菌Rocceta菌株，阳性菌液经

0.1 mM IPTG诱导后表达目的蛋白。通过SDS-PAGE凝胶电泳和考马斯亮蓝染色，可以在诱导菌样中检测到P7-1蛋白与6×His标签融合表达的大小约43 kDa的蛋白，与预测的蛋白大小相符，而未加诱导剂的菌样没有对应的条带（图4-2），表明P7-1蛋白被特异性诱导表达。



图4-2. SDS-PAGE分析SRBSDV P7-1蛋白在*E. Coil*. 中的表达

Fig. 4-2. SDS-PAGE detected the expression of P7-1 protein of SRBSDV in*E. Coil*. Lane M, protein Marker; Lane 1, Proteins expression induced by IPTG; Lane 2, Proteins expression without IPTG

#### **4.3.1.3** **P7-1**蛋白抗体的检测

分别以携带SRBSDV的白背飞虱和未携带SRBSDV的白背飞虱总蛋白为样品，经12%的SDS-PAGE凝胶电泳后用制备的P7-1抗血清进行Western blot分析。结果显示携带SRBSDV的白背飞虱总蛋白中含有40.9 kDa的蛋白条带，与预测的P7-1蛋白大小相符，而未侵染SRBSDV的白背飞虱总蛋白中检测不到P7-1蛋白，表明所制备的抗体具有特异性，可用于免疫荧光标记实验（图4-3）。



图4-3. Western blot检测SRBSDV P7-1蛋白抗体的特异性

Fig. 4-3. Western blot analysis detected the specificity of antibodies against P7-1.

Lane M, protein marker; Lane 1, protein extracts from WBPHs infected with SRBSDV; Lane 2, protein extracts from SRBSDV-free WBPHs.

### **4.3.2** **P7-1**蛋白在培养细胞中的定位

#### **4.3.2.1** **P7-1**蛋白在白背飞虱培养细胞中形成管状结构

用提取的SRBSDV粗提液侵染培养在coverglass上的白背飞虱培养细胞2 d，然后分别用P7-1-rhodamine和P9-1-FITC抗体标记P7-1和P9-1蛋白，共聚焦显微镜下可观察到P7-1-rhodamine标记在SRBSDV侵染细胞后形成的管状结构上

（图4-4A），存在P7-1蛋白的细胞中也可以观察到P9-1蛋白，表明SRBSDV编码的P7-1蛋白在SRBSDV侵染的培养细胞中能形成小管状结构。同时发现P7-1蛋白无序地分布在成片的单层细胞中，或者横跨在相邻的两个细胞上；而在单个的梭状细胞中P7-1蛋白分布在细胞向周围生长的丝状伪足中（图4-4B）。



图4-4. P7-1蛋白在SRBSDV侵染的白背飞虱培养细胞中的定位

Fig. 4-4. Subcellular localization of P7-1 in SRBSDV-infected VCMs of WBPHs.

A, the localization of P7-1 and P9-1 in epithelium-like cell sheets; B, the localization of P7-1 and P9-1 in fibroblast-like cells. Bars, 10μm.

#### **4.3.2.2** 电镜观察**P7-1**蛋白形成的包裹病毒粒体的管状结构

通过共聚焦显微镜已观察到P7-1蛋白在培养细胞中可形成小管状结构，为了进一步观察P7-1蛋白在培养细胞中的定位，本研究对SRBSDV侵染2 d的白

背飞虱培养细胞分别制备电镜切片和免疫电镜切片。在电子显微镜下观察到病毒侵染的培养细胞中存在直径约85 nm的小管结构，并且小管中包裹着直径约70

nm的病毒粒体（图4-5A），从管状结构的纵切面可以观察到该管状结构呈卷筒状，病毒粒体被包裹在卷筒状的小管内（图4-5B）。通过免疫胶体金标记发现在管状结构的横切面和纵切面中P7-1抗体均能特异性地与包裹病毒粒体的小管结构结合（图4-6）。以上结果充分证明了SRBSDV在培养细胞中形成的包裹病毒粒体的管状结构是由SRBSDV编码的P7-1蛋白以卷筒状形式形成并将病毒粒体包裹在管中。



图4-5 SRBSDV在侵染细胞中形成包裹病毒粒体的管状结构Fig. 4-5. Tubular structures contaied virus particles were formed in

SRBSDV-infected VCMs. A, longitudinal sectin of tubules in virus-infected VCMs. B, cross section of tubules in virus-infected VCMs. Bars, 100 nm.



图4-6. P7-1蛋白在SRBSDV侵染的培养细胞中的定位

Fig. 4-6. Subcellular localization of P7-1 of SRBSDV in virus-infected VCMs by Electron micrograph. A, longitudinal sectin of tubules in virus-infected VCMs. B, cross section of tubules in virus-infected VCMs. Bars, 100 nm.

### **4.3.3** **P7-1**蛋白参与病毒在细胞间的扩散

从图4-4可以观察到P7-1蛋白形成的管状结构分布在细胞内和细胞间，通过电镜切片也可以观察到包裹病毒粒体的小管从一个细胞伸向邻近的细胞（图4-7），因此推测P7-1形成的包裹病毒粒体的管状结构可能参与病毒的胞间扩散。为了验证P7-1蛋白在病毒胞间扩散过程中的作用，本研究在病毒侵染后的细胞培养基中加入病毒中和抗体IgG，病毒中和抗体可以与病毒侵染培养细胞后产生的游离于培养基中的病毒粒体结合，使游离的病毒粒体失去再侵染能力。在病毒侵染3 d后，通过免疫荧光标记方法检测病毒在培养细胞间是否进行了扩散。



图4-7 包裹病毒粒体的管状结构伸向邻近的细胞

Fig. 4-7. Tubular structures contained virus particles and extended toward neighboring cells.

Bars, 250 nm.

共聚焦显微镜观察结果显示在未添加病毒抗体的对照组培养细胞中，病毒向邻近的细胞发生了扩散，而且在距离初侵染较远的地方也有零星的细胞被病毒侵染（图4-8A）。而在添加病毒抗体的培养细胞中病毒仍可从初侵染细胞扩散到邻近的细胞，形成一个紧密的侵染区，且P7-1管状结构分布在被侵染的细胞间（图4-8B）。以上结果表明，加入病毒中和抗体抑制游离病毒粒体的再侵染后，病毒仍可以借助包裹病毒粒体的管状结构将病毒扩散到邻近的细胞，在此过程中P7-1蛋白形成的管状结构起到了病毒扩散的功能。



图4-8. P7-1管状结构参与SRBSDV在培养细胞中的胞间扩散

Fig. 4-8. P7-1 tubular structure takes part in the spread of SRBSDV IN VCMs in the presence of virus-neutralizing antibodies. A, VCMs treated without virus-neutralizing antibodies; B, VCMs treated with virus-neutralizing antibodies. Bars, 10μm.

### **4.3.4** **dsP7-1**抑制管状结构的形成和病毒在细胞间的扩散

为了进一步明确P7-1蛋白在病毒扩散过程中的作用，本研究利用dsRNA诱导的RNAi技术在白背飞虱培养细胞中验证P7-1蛋白的功能。首先取2片培养白背飞虱培养细胞的coverglass，分别用dsP7-1和dsGFP处理6 h，接着用高浓度的病毒粗提液侵染2 h，病毒侵染后3 d的培养细胞用于免疫荧光标记检测。共聚焦显微镜下观察到病毒侵染后3 d, dsGFP处理没有影响培养细胞中P7-1蛋白形成管状结构以及P9-1 蛋白形成病毒原质（图4-9A）；而dsP7-1 处理的

coverglass上，P7-1管状结构的形成受到明显的抑制，而且仅有单细胞被病毒侵染（图4-9B），病毒的侵染率低于dsGFP处理的对照组（图4-9C），表明dsP7-1诱导的RNAi可以特异性抑制P7-1蛋白的表达，从而抑制管状结构的形成，最终导致病毒无法从初侵染细胞向邻近的健康细胞扩散。同时，dsP7-1处理的细胞中仍可观察到P9-1蛋白形成的病毒原质，表明P9-1蛋白的表达并没有受到抑制，病毒仍可在侵染细胞中形成病毒原质并进行复制。



图4-9 dsP7-1抑制P7-1管状结构的形成

Fig. 4-9. RNAi induced by dsP7-1 inhibited the formation of P7-1 tubular structure A, VCMs treated with dsGFP; B, VCMs treated with dsP7-1. Bars, 10μm.

应用免疫荧光标记方法可以明确dsP7-1显著抑制了P7-1蛋白的表达，同时

也阻碍了病毒的二次侵染。为了分析dsP7-1对病毒编码的其他蛋白的影响，本研究应用Western blot和RT-qPCR方法对dsP7-1处理后病毒在培养细胞中编码的P7-1、P9-1和P10蛋白表达量进行了检测。Western blot分析结果显示经dsP7-1处理的培养细胞中P7-1蛋白的表达量显著下降，而形成病毒原质的P9-1和病毒外壳蛋白P10表达量与对照比较接近（图4-10A）；RT-qPCR检测结果显示dsP7-1处理的细胞中P7-1蛋白的表达量为对照的15%, P9-1和P10蛋白的表达量分别为对照的70%和75%（图4-10B）。以上结果表明由dsP7-1诱导的RNAi可以显著抑制P7-1蛋白的表达，而病毒原质组分P9-1蛋白和病毒外壳蛋白P10的表达量有较小的下降，其原因可能的是dsP7-1干扰P7-1形成管状结构，抑制了病毒的扩散，从而抑制了病毒的大量复制。



图4-10. dsP7-1处理抑制P7-1蛋白在培养细胞中的表达

Fig. 4-10. RNAi induced by dsP7-1 significantly inhibited the expression of P7-1 protein in VCMs. A, detected the expressions of proteins of SRBSDV by western blot; Line 1,

VCMs treated with dsGFP; Line 2, VCMs treated with dsP7-1; Line 3, healthy VCMs. B, detected the expressions of proteins of SRBSDV by RT-qPCR.

### **4.3.5** **P7-1**蛋白在白背飞虱消化系统的扩散途径

已知P7-1蛋白能形成包裹病毒粒体的管状结构，并且在介体培养细胞中具有帮助病毒扩散的功能。为了明确P7-1蛋白在介体白背飞虱消化系统的功能，本研究在病毒侵染后的不同时间段，将解剖获得的白背飞虱消化系统经过固定、渗透和抗体孵育，于共聚焦显微镜下观察P7-1蛋白在白背飞虱消化系统的分布。实验中用P7-1-FITC 标记昆虫消化系统中病毒编码的P7-1 蛋白（绿色），

phalloidin–rhodamine标记组成昆虫消化系统的Actin（红色）。在白背飞虱饲毒后的2、4、6和8 d分别解剖50头白背飞虱，P7-1蛋白在不同器官的分布如表4-2所示。饲毒后2 d，80%的白背飞虱中肠上皮细胞内可以观察到P7-1蛋白形成的管状结构（图4-11A, 表4-2），表明病毒已侵入中肠上皮细胞并形成了P7-1管状结构。饲毒后4 d，80%以上的白背飞虱中肠上皮细胞可观察到大量的P7-1蛋白，由P7-1蛋白形成的管状结构即将穿过基底膜到达中肠表面，且约20%的白背飞虱体内已发现P7-1蛋白扩散到中肠表面，表明病毒在白背飞虱的中肠上皮细胞进行大量的复制并形成了大量包裹病毒粒体的管状结构（图4-11B, 表4-2）。饲毒后6 d，在中肠表面的肌肉组织上分布着大量的P7-1管状结构（图4-11C，

D），上皮细胞内仍有少量P7-1蛋白的分布（图4-11E），表明中肠上皮细胞内的大部分P7-1管状结构已扩散到中肠表面的肌肉组织，仅有少量的管状结构仍存在于上皮细胞内。到达中肠表面的P7-1管状结构沿着环肌和纵肌向后肠、食道、前憩室等器官扩散。约20%的白背飞虱的唾液腺中可以观察到P7-1管状结构（图4-11 F），表明病毒在部分昆虫体内已扩散到唾液腺。饲毒后8 d, P7-1管状结构分布在整个中肠和后肠表面的肌肉组织，而在中肠上皮细胞内已观察不到P7-1蛋白，70%以上的白背飞虱唾液腺中存在大量的P7-1 蛋白（图4-11G-J），表明中肠上皮细胞内的P7-1管状蛋白已完全扩散到白背飞虱中肠表面并扩散到消化系统的其他器官，达到了系统性扩散，尤其是已扩散到白背飞虱的唾液腺（图4-11J）。

表4-2 病毒侵染不同时间P7-1蛋白在白背飞虱消化系统的分布

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tissue a | No. positive insects with P7-1 antibody in different tissues (n=50) | | | |
| 2 days | 4 days | 6 days | 8 days |
| me | 41 | 43 | 42 | 0 |
| mv-mg | 0 | 11 | 42 | 43 |
| hg | 0 | 0 | 13 | 38 |
| sg | 0 | 0 | 9 | 37 |

Table 4-2. Localization of P7-1 in digestive system of WBPHs at different days padp as detected by immunofluorescence microscopy

a：每个处理解剖50头白背飞虱，通过P7-1-FITC荧光抗体检测P7-1蛋白在昆虫消化系统的分布；me：中肠上皮细胞；vm-mg：中肠表面肌肉；hg：后肠；sg：唾液腺

以上结果表明P7-1蛋白在介体白背飞虱体内首先在中肠上皮细胞中形成，

随后扩散到中肠表面的肌肉组织并进行扩散，最后扩散到唾液腺，完成在白背飞虱体内的扩散过程，而且P7-1蛋白的扩散途径与SRBSDV的侵染循回途径相一致。



图4-11. P7-1蛋白在白背飞虱消化系统的分布

Fig. 4-11. The localization of P7-1 in the digestive system of WBPH

Ad, Anterior diverticulum; mg, midgut; hg, hindgut; mt, malpighian tubules; os, oesophagus; sg, salivary gland; me, midgut epithelium; mv, microvilli; vm, visceral muscle; Bars, 70µm.

### **4.3.6** **P7-1**蛋白在中肠表面的扩散方式

P7-1蛋白形成的管状结构作为病毒在介体内扩散的通道，在病毒从中肠上皮细胞向中肠表面以及其他器官的扩散过程中起着重要的作用。SRBSDV侵染白背飞虱4 d后，通过共聚焦显微镜观察到白背飞虱的中肠上皮细胞内存在大量的P7-1蛋白，同时病毒初侵染的上皮细胞以外的中肠表面环肌上也分布着P7-1

蛋白，表明P7-1蛋白形成的管状结构从中肠上皮细胞向中肠外扩散，首先到达中肠表面的环肌，并沿着环肌扩散（图4-12A-C）。P7-1管状结构不仅在中肠表面的环肌上分布，而且也分布在与环肌交叉的纵肌上（图4-12D-G），表明沿着环肌扩散的部分管状蛋白扩散到与环肌交叉的纵肌上，并沿着纵肌扩散到中肠其他部位以及中肠以外的其他器官。在P7-1管状蛋白早期到达的肌肉组织上可观察到P9-1蛋白，表明P7-1管状蛋白经过后被病毒开始侵染并进行复制（图4-12 D, F, G）。当病毒侵染8 d后，在白背飞虱消化系统的表面能观察到大量的P7-1管状蛋白和P9-1蛋白（图4-12H），表明P7-1管状蛋白已完成系统性扩散并已将病毒扩散到整个消化系统表面的肌肉组织。

### **4.3.7** **P7-1**蛋白与白背飞虱**Actin**的互作

通过免疫荧光标记方法发现P7-1蛋白形成的管状结构可以沿着中肠表面的肌肉组织扩散（图4-13），而肌肉组织主要由Actin组成，因此推测P7-1蛋白与肌肉组织的Actin之间存在互作关系。本研究首先将P7-1和Actin基因分别构建到酵母双杂交系统的诱饵载体和文库载体上，重组载体转化酵母菌株NMY51后通过选择培养基验证P7-1与Actin蛋白间的互作。实验结果显示pBT3-STE-P7-1与pPR3-N-Actin共转化菌和阳性对照均可以在SD-Trp-Leu-His-Ade培养基上生长，而pBT3-STE-P7-1与pPR3-N的共转化菌和阴性对照均不可以在SD-Trp-Leu-His-Ade培养基上生长（图4-14A）。结果表明P7-1蛋白可以与白背飞虱的Actin蛋白在酵母菌中发生特异性的互作。

为了进一步验证P7-1蛋白与Actin的互作，本实验利用P7-1抗体进行免疫共沉淀实验。首先将提取的带毒白背飞虱和无毒白背飞虱总蛋白分别与P7-1抗体孵育，然后加入Protein A琼脂糖充分孵育，用洗涤液洗涤Protein A琼脂糖后加入上样buffer并煮沸10 min, SDS-PAGE凝胶电泳后通过Western blot检测样品中的P7-1和Actin蛋白，同时检测未处理的带毒和无毒白背飞虱样品中的P7-1和Actin蛋白。检测结果显示在添加和未添加P7-1抗体的带毒白背飞虱蛋白样品中均检测到P7-1和Actin蛋白，而在添加P7-1抗体的无毒白背飞虱样品中检测不到P7-1蛋白也检测不到Actin蛋白，未添加抗体的无毒白背飞虱样品中只检测Actin蛋白。以上实验结果表明带毒白背飞虱样品中P7-1蛋白与Actin存在特异性互作而发生共沉淀现象（图4-14B）。



图4-12. P7-1蛋白在中肠表面的分布

Fig. 4-12. P7-1 tubules localized on the surface of midgut in viruliferous WBPHs. mg, midgut; me, midgut epithelium; lm, longitudinal muscle; cm, circular muscle; Bars, 70μm.



图4-13. P7-1蛋白分布在中肠表面的环肌和纵肌上

Fig. 4-13. P7-1 tubules localized along actin-based circular and longitudinal muscle

That surround the midgut of WBPHs. lm, longitudinal muscle; cm, circular muscle. Bar, 70μm.



图4-14 酵母双杂交和免疫共沉淀方法验证P7-1蛋白与Actin的互作

Fig. 4-14. P7-1 of SRBSDV interacted with Actin of WBPH.

A, Yeast two-hybrid assay showing the interaction of P7-1 and Actin proteins.

1, pBT3-STE-P7-1/pPR3-N-Actin; 2, pBT3-STE-P7-1/pPR3-N; 3, positive control of pTSU2-APP/pNubG-Fe65; 4, negative control of pTSU2-APP / pPR3-N.

B, coimmunoprecipitation assay showing the interaction of P7-1 and Actin proteins.

### **4.3.8** **dsP7-1**阻碍病毒在白背飞虱消化系统的扩散

#### **4.3.8.1** **dsP7-1**抑制**SRBSDV**在白背飞虱体内的侵染

通过免疫荧光标记和免疫电镜技术已明确SRBSDV编码的P7-1蛋白在培养细胞中形成包裹病毒粒体的管状结构具有帮助病毒进行胞间扩散的功能。为了进一步明确P7-1蛋白在介体昆虫体内的功能，本研究通过膜饲喂法首先将人工合成的源于P7-1基因的dsRNA饲喂白背飞虱1 d，同时饲喂人工合成的源于GFP基因的dsRNA和单独饲喂人工饲料作为对照。接着饲毒2 d，然后转到健康水稻上饲养。饲毒后12 d，每个处理分别抓取50头虫子并提取单头虫子的总RNA，通过RT-PCR检测白背飞虱的带毒率。PCR检测结果如表4-3所示：饲喂dsGFP的白背飞虱带毒率与单独饲喂人工饲料的带毒率约为87%，而饲喂dsP7-1的白

背飞虱带毒率仅为24%左右，显著低于对照处理。以上结果表明饲喂人工合成的源于P7-1基因的dsRNA显著地抑制了SRBSDV侵染白背飞虱。

表4-3. dsP7-1抑制SRBSDV在白背飞虱体内的侵染

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Treatment a | No. of insects giving positive results（n=50） | | |
| 1 | 2 | 3 |
| dsP7-1 | 13 | 12 | 10 |
| dsGFP | 42 | 40 | 44 |
| CK | 44 | 45 | 42 |

Table 4-3. RNAi induced by dsP7-1 inhibited infection by SRBSDV in the body of WBPHs

a：每个处理抓取50头白背飞虱，通过RT-PCR检测每头虫子的带毒情况，重复3 次

P7-1蛋白在培养细胞中参与病毒的胞间扩散，但并不影响病毒的初侵染，而在昆虫体内却降低了白背飞虱的带毒率。为此本实验提取了饲毒后12d白背飞虱总蛋白和总RNA，以及昆虫体内病毒的dsRNA，通过Western blot和RT-qPCR方法分析了饲喂dsP7-1对病毒在白背飞虱体内编码的P7-1、P9-1和P10蛋白表达的影响，通过SDS-PAGE凝胶电泳检测了昆虫体内的病毒含量。Western blot检测结果显示饲喂dsP7-1的处理组中病毒编码的P7-1、P9-1和P10蛋白表达量均显著低于饲喂人工饲料的对照组（图4-15A），同时RT-qPCR 检测发现饲喂dsP7-1的处理组中病毒编码的P7-1、P9-1和P10蛋白表达量分别为对照组的

10%、8%和25%，显著低于饲喂dsGFP的对照组（图4-15B）。此外对昆虫体内病毒基因组dsRNA的检测结果显示饲喂dsP7-1的白背飞虱体内SRBSDV的基因组dsRNA含量显著低于饲喂dsGFP的对照组（图4-16）。以上检测结果均表明饲喂dsP7-1显著抑制了SRBSDV在白背飞虱体内的侵染。

A

P7-1

1 2 3

B



1.2

1

DsGFP dsP7-1

P9-1

P10

Actin

0.8

相0.6

对

表0.4

达

量0.2

0

P7-1 P9-1 P10

图4-15. dsP7-1处理抑制SRBSDV编码蛋白在昆虫体内的表达

Fig. 4-15. RNAi induced by dsP7-1 significantly inhibited the expression of proteins encoded by SRBSDV in WBPHs. A, detected the expression of proteins encoded by SRBSDV by

Western blot; Line 1, insects treated with dsGFP; Line 2, insects treated with dsP7-1; Line 3, healthy insects; B, detected the expression of proteins encoded by SRBSDV by RT-qPCR



图4-16. dsP7-1抑制SRBSDV基因组的复制

Fig. 4-16. RNAi induced by dsP7-1 significantly inhibited the replication of SRBSDV genome in WBPHs. Detected the genome dsRNA of SRBSDV by SDS-PAGE.

#### **4.3.8.2** **dsP7-1**抑制病毒在白背飞虱消化系统的扩散

为了验证P7-1蛋白在昆虫体内是否参与病毒的扩散，本研究通过膜饲喂的方法分别用混合人工饲料的dsP7-1和dsGFP饲喂1-2龄的白背飞虱若虫1 d，接着在SRBSDV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻上饲养。饲毒后的

2、4、6、9 d分别抓取50头虫子用于免疫荧光标记并观察病毒在昆虫消化系统中的复制和扩散情况。实验中分别用P9-1-FITC和P7-1-rhodamine标记病毒编码的P9-1和P7-1蛋白，用phalloidin-Alexa Fluor 647标记昆虫的Actin。

饲毒后2 d，约84%饲喂dsGFP的白背飞虱的少数上皮细胞中可观察到P9-1和P7-1蛋白，而仅有24%饲喂dsP7-1的白背飞虱的少数上皮细胞中可观察到少量P9-1蛋白和少量P7-1蛋白（图3-17A），表明dsP7-1特异性干扰了P7-1蛋白的表达并显著地抑制了病毒在中肠上皮细胞的初侵染。饲毒后4 d，80%饲喂

dsGFP的白背飞虱体内可以观察到P9-1和P7-1蛋白广泛分布在中肠上皮细胞内，同时56%的白背飞虱中肠表面已有P9-1和P7-1蛋白的分布，而此时饲喂dsP7-1的白背飞虱仅有26%可在中肠上皮细胞中观察到P9-1和P7-1蛋白，且大量的上皮细胞中只能观察到P9-1蛋白，观察不到P7-1蛋白，同时还还未观察到病毒扩散到中肠表面（图3-17B），表明dsP7-1干扰P7-1蛋白的表达，从而抑制了病毒从中肠上皮细胞向中肠表面的扩散。饲毒后6 d，24%饲喂dsGFP的白背飞虱体内P9-1和P7-1蛋白已扩散到后肠表面，同时12%白背飞虱的唾液腺中已观察到P9-1和P7-1蛋白的分布，然而饲喂dsP7-1的白背飞虱体内病毒仍然仅分布在中肠上皮细胞内，仅有10%的白背飞虱中肠表面有P9-1和P7-1蛋白的分布

（表4-4）。饲毒后9 d，78%饲喂dsGFP的白背飞虱体内P9-1和P7-1蛋白已扩散到唾液腺，同时在中肠上皮细胞内已观察不到P9-1和P7-1蛋白的分布，然而

饲喂dsP7-1的白背飞虱中肠上皮细胞内仍然有P9-1和P7-1蛋白的分布，仅有

16%的白背飞虱后肠表面有P9-1和P7-1蛋白的分布（表4-4），而唾液腺中仍然检测不到P9-1和P7-1蛋白（图4-17C），表明饲喂dsP7-1抑制了病毒在白背飞虱消化系统的扩散。以上结果表明干扰管状结构组分P7-1蛋白的表达可以抑制病毒在昆虫体内的扩散以及限制病毒的复制。



图4-17. dsP7-1抑制SRBSDV在白背飞虱消化系统的扩散

Fig. 4-17. Ingestion of dsP7-1 suppressed SRBSDV spread in digestive system of WBPHs. At 2 days padp (A), 4 days padp (B), and 9 days padp (C), internal organs of WBPHs receiving dsP7-1 or dsGFP were stained for viroplasm with P9-1-FITC (green), stained for P7-1 tubules

With P7-1-rhodamine (red), and stained for actin with actin dye phalloidin-Alexa Fluor 647 carboxylic acid (blue). mg, midgut; sg, salivary gland. Bars, 70μm.

表4-4 饲喂dsP7-1影响P7-1和P9-1蛋白在白背飞虱消化系统的分布

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. of SRBSDV-infected insects（n=50） | | | | | | | | | | | |
| Tissue a | 2 days | | 4 days | | | 6 days | | | 9 days | | |
|  | dsP7-1 | dsGFP |  | dsP7-1 | dsGFP |  | dsP7-1 | dsGFP |  | dsP7-1 | dsGFP |
| me | 12 | 42 |  | 13 | 40 |  | 12 | 40 |  | 12 | 0 |
| vm-mg | 0 | 0 |  | 0 | 28 |  | 5 | 40 |  | 12 | 43 |
| vm-hg | 0 | 0 |  | 0 | 0 |  | 0 | 12 |  | 8 | 43 |
| sg | 0 | 0 |  | 0 | 0 |  | 0 | 9 |  | 0 | 39 |

Table 4-4. Ingestion of dsP7-1 effected the localization of P7-1 and P9-1 in digestive system of WBPHs

a：每个处理解剖50头白背飞虱；me：中肠上皮细胞；vm-mg：中肠表面肌肉；vm-hg：后肠表面肌肉；sg：唾液腺

### **4.3.9** 饲喂**dsP7-1**阻碍白背飞虱传播**SRBSDV**

白背飞虱饲喂人工合成的dsP7-1、dsGFP或单独的人工饲料后饲毒2 d，随后转到健康水稻上饲养10 d，然后以单管单虫单苗传毒，传毒后的水稻幼苗在防虫条件下生长一个月后观察其发病情况。统计结果表明饲喂dsGFP的白背飞虱与单独饲喂人工饲料的白背飞虱带毒率和传毒率相近，带毒率和传毒率分别为

85%和60%，而饲喂dsP7-1的白背飞虱带毒率约为25%，传毒率为零（表4-5），表明饲喂dsP7-1 不仅阻碍了SRBSDV 在白背飞虱体内的侵染，而且抑制了

SRBSDV在白背飞虱体内的扩散，从而阻碍白背飞虱将病毒传播到水稻。

表4-5 饲喂dsP7-1抑制白背飞虱传播SRBSDV

Table 4-5. Ingestion of dsP7-1 inhibited the transmission of SRBSDV by WBPH

| No. of insects giving positive results ( n=50) | | | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Treatment a | Experiment 1 | | Experiment 2 | | | Experiment 3 | | |
|  | Infected | Transmitted |  | Infected | Transmitted |  | Infected | Transmitted |
| dsP7-1 | 12 | 0 |  | 12 | 0 |  | 13 | 0 |
| dsGFP | 43 | 31 |  | 40 | 28 |  | 44 | 30 |
| CK | 45 | 32 |  | 46 | 33 |  | 43 | 30 |

a：每个处理取50头白背飞虱进行传毒，RT-PCR检测昆虫带毒率，重复3 次

## **4.4** 讨论

本研究所制备的P7-1蛋白多克隆抗体可通过Western blot分析特异性地检测

SRBSDV侵染水稻病株中表达的P7-1蛋白，且提纯的IgG与荧光素交联后可特异性标记SRBSDV侵染白背飞虱后由P7-1蛋白形成的管状结构，充分证明所制备的抗体具有特异性，可用于P7-1蛋白的功能研究。

已知P7-1蛋白可在非寄主昆虫细胞Sf9中形成伸出细胞的小管状结构（Liu

*et al*., 2011）。本研究通过P7-1抗体标记SRBSDV侵染白背飞虱培养细胞和昆虫

消化系统所表达的P7-1蛋白，证实了P7-1蛋白可形成管状结构的结论。通过电子显微镜观察到P7-1蛋白形成的管状结构中包裹着病毒粒体，该结构与RDV编码的Pns10在介体昆虫体内形成的管状结构相似（Wei *et al*., 2006a; Katayama *et al*., 2007）。通过电子显微镜可以清晰地观察到管状结构的横切面呈卷筒状，并且P7-1抗体的胶体金颗粒特异性地与其结合。同时从管状结构的纵切面可观察到病毒粒体被双层管包裹（图4-5），这是首次发现的病毒编码蛋白以卷筒状将病毒粒体包裹而形成的管状结构。

P7-1蛋白形成的管状结构在白背飞虱培养细胞中的分布方式与细胞的类型有关，在成片的单层细胞中呈无序分布，而在单个的梭状细胞中则沿着细胞向四周伸出的丝状伪足有序分布（图4-4）。同时P7-1管状结构在白背飞虱的中肠上皮细胞内无序分布，而在中肠表面的肌肉组织上则顺着环肌和纵肌的延伸有序分布（图4-13）。由此可以推测P7-1管状结构的分布依赖于细胞内的骨架成分如细胞中的Actin。在单层培养细胞和中肠上皮细胞内Actin分布呈无序的网状，而在梭状细胞的丝状伪足和中肠表面的肌肉组织中Actin分布相对有序。本研究通过酵母双杂交和免疫共沉淀方法证明了P7-1蛋白与白背飞虱Actin之间存在互作关系，表明P7-1蛋白借助与Actin的互作实现在中肠表面肌肉组织的运动。已有的研究表明，Actin与多种病毒的运动蛋白互作帮助病毒完成胞间扩散，如

RDV编码的Pns10小管可以与介体叶蝉的Actin互作，使Pns10沿着以Actin为主要组成成分的丝状伪足向健康细胞延伸（Wei *et al*., 2006a）；RSV编码的运动蛋白Nsvc4利用植物细胞中的actin-myosin运动通道到达胞间连丝并发挥帮助病毒运动的功能（Yuan *et al.*, 2011）；F-actin帮助黄瓜花叶病毒的运动蛋白增大胞间连丝的孔径，从而帮助病毒进行胞间扩散（Su *et al.*, 2010）。

P7-1管状结构包裹着病毒粒体在细胞间以及中肠表面的肌肉组织上扩散，必然具有重要的生物学功能。通过观察P7-1蛋白在中肠表面的扩散过程，发现病毒在肌肉组织上的复制位点均为P7-1管状结构已到达的位点，而在P7-1管状结构运动的最前端病毒还未进行复制，因此推测其能帮助病毒进行昆虫体内的扩散。本研究通过病毒中和抗体实验发现封闭培养细胞中游离的病毒粒体后，病毒仍可通过包裹病毒粒体的管状结构顺利地扩散到邻近的细胞并进行再侵染。由此证明P7-1管状结构是病毒扩散的一个相对安全的通道；P7-1管状结构包裹着病毒粒体，不仅可以避免细胞内溶物对病毒粒体侵染活性的破坏，还可以协助病毒突破细胞间的多种侵染屏障，如RDV编码的Pns10小管可穿过中肠微绒毛，帮助病毒粒体突破微绒毛屏障顺利地进入中肠肠腔及邻近的细胞（Chen *et al*., 2012）。

通过比较，可以发现SRBSDV形成的P7-1管状结构在昆虫体内的扩散途径与SRBSDV的侵染循回途径一致。P7-1管状结构从中肠上皮细胞向中肠表面扩

散，随后在中肠表面的肌肉组织上沿着环肌和纵肌向邻近的器官扩散，其扩散途径与RDV形成的Pns10小管扩散途径却有所不同。RDV Pns10小管存在从中肠上皮细胞向中肠表面和中肠肠腔两个方向扩散的途径（Chen *et al*., 2012），而P7-1小管仅存在向中肠外表扩散的途径，因此至今未观察到P7-1管状结构穿过微绒毛的现象。由此可见，同样是侵染水稻的呼肠孤病毒，同样借助包裹病毒粒体的管状结构进行扩散，但在介体昆虫体内的扩散方式却存在较大的差异。

SRBSDV编码的P7-1管状结构从中肠上皮细胞扩散到中肠表面肌肉组织的过程中需要突破基底膜屏障，但本研究通过共聚焦显微镜还未获得P7-1管状结构穿越基底膜的直接证据，有待于借助电子显微镜细致地观察。P7-1管状结构到达中肠表面肌肉组织后，由于中肠表面的环肌最靠近上皮细胞，纵肌分布在环肌外层，因此P7-1管状结构首先沿着环肌向侵染点的两侧扩散。扩散过程中P7-1管状结构将病毒粒体释放到环肌上进行二次侵染形成病毒原质。P7-1管状结构沿着环肌扩散的过程中遇到与其交叉的纵肌后，开始沿着纵肌扩散。由于纵肌纵向排列在中肠表面，并与消化系统的其他器官相连，因此P7-1管状结构可以沿着纵肌快速扩散到中肠以及邻近的器官并将病毒粒体释放到消化系统，实现病毒在昆虫消化系统的快速扩散。P7-1管状结构沿着环肌和纵肌的扩散导致整个消化道的表面成为病毒复制的场所，为病毒在介体昆虫体内的增殖提供了充足的空间。

P7-1管状结构的存在帮助了病毒的扩散，为了进一步明确P7-1蛋白在病毒扩散过程中的功能，本研究利用dsRNA诱导的RNAi技术在培养细胞中验证了P7-1蛋白的功能。实验结果显示干扰P7-1蛋白的表达可以抑制P7-1管状结构的形成，从而降低病毒在培养细胞中的侵染率，但病毒仍可在细胞中形成病毒原质。该结果一方面证明了P7-1蛋白是形成管状结构的组分，另一方面验证了P7-1蛋白参与病毒的胞间扩散。同时结合Western blot和RT-qPCR方法明确了干扰P7-1蛋白的表达并不影响SRBSDV在培养细胞内的复制和组装。

dsRNA诱导的RNAi技术不仅可以在细胞水平上应用，而且可以通过注射或膜饲喂法应用于昆虫个体（Liu *et al*., 2010; Chen *et al*., 2012）。本研究通过膜饲喂法将人工合成的dsP7-1导入白背飞虱体内，显著地抑制了P7-1蛋白在昆虫体内的表达和形成管状结构，但并不影响病毒原质组分P9-1蛋白在中肠上皮细胞内的表达。P7-1管状结构的形成受到抑制后，严重阻碍了P7-1管状结构在昆虫消化系统的扩散，使病毒被限制在侵染位点或缓慢地进行扩散，从而阻碍了

SRBSDV在白背飞虱体内进行大量的复制和侵染，因此饲喂dsP7-1的白背飞虱体内病毒编码蛋白的表达量和病毒基因组dsRNA显著降低（图4-16B）。由于病毒在白背飞虱体内的扩散受阻，以及病毒量的不足，导致饲喂dsP7-1的白背飞虱失去了传毒能力。由此证明SRBSDV编码的P7-1蛋白在昆虫体内起着病毒扩

散的功能，干扰P7-1蛋白的表达可以显著地抑制病毒在昆虫体内的侵染以及昆虫对病毒的传播。通过饲喂表达P7-1 基因siRNA 的转基因水稻也能抑制

SRBSDV在白背飞虱体内的侵染，然而该转基因水稻并不具有抗病性（戴兆基，

2012）。由此认为SRBSDV编码的P7-1基因主要在介体昆虫体内参与病毒的扩散，而在水稻寄主中干扰P7-1蛋白的表达并不影响SRBSDV的侵染，P7-1蛋白在水稻寄主中的功能还有待于进一步研究。因此P7-1基因作为靶标基因制备转基因水稻可用于白背飞虱取食后阻止白背飞虱携带和传播SRBSDV，但不能阻止已带毒且具备传毒能力的白背飞虱向水稻传播SRBSDV。

本章研究发现病毒的扩散被抑制后限制了病毒在更广阔的细胞或器官中复制，而上一章研究发现病毒在介体内的复制量较低也会延缓或阻碍病毒的扩散，由此认为病毒的复制和扩散既是相互独立的过程，又存在相互制约的关系，当两者协调发生时促进病毒的增殖和快速扩散，从而使白背飞虱具有高效传播

SRBSDV的能力。

# **5.** RRSV在褐飞虱体内的侵染循回和复制

近年来由RRSV引起的水稻齿叶矮缩病在我国南方稻区再次发生，并与其他水稻病毒病共存。该病害在上世纪七八十年代大面积发生，然而在1990-2005

年间，该病害在东南亚地区均没有流行发生的报道。直至2006年，越南北部大面积暴发水稻齿叶矮缩病（Du *et al*., 2007），同年在福建省沙县也局部暴发。随后该病害在福建省内蔓延发生。在2009-2010年间，伴随着南方水稻黑条矮缩病

在南方稻区13个省份的稻区暴发，本实验室从海南、云南、广西、广东、湖南等省区采集的水稻样本中均检测到RRSV病株。由RRSV引发的水稻病害已扩散到我国南方的多个省份，对我国的水稻生产带来了新的危害。

RRSV由介体褐飞虱（*Nilaparvata lugens*）以持久增殖型方式传播。目前关于褐飞虱传播RRSV的传毒特性已比较明确，但关于RRSV在介体褐飞虱体内的侵染循回过程还未曾报道。植物呼肠孤病毒侵染寄主细胞后通常由病毒编码的非结构蛋白形成病毒原质进行复制。目前对RRSV编码的三个非结构蛋白Pns6、

Pns7和Pns10的功能已有一些研究，但对其在形成病毒原质和参与病毒复制过程中的功能还不清楚。

本章通过免疫荧光标记技术系统地分析了RRSV在褐飞虱体内的侵染循回途径；利用杆状病毒真核表达系统在非寄主昆虫细胞Sf9中表达RRSV编码的三个非结构蛋白，结合免疫荧光标记和免疫电镜技术明确Pns10是形成病毒原质基质的组分；最后通过dsRNA诱导的RNAi技术验证了Pns10在RRSV侵染过程中的功能。

## **5.1** 材料与方法

### **5.1.1** 水稻病毒毒源和介体昆虫

感染RRSV的水稻病株采自云南省施甸市，采回后种植在本所实验室田间水稻病毒圃。介体褐飞虱采自福建农林大学水稻田，并于25℃条件下饲养在水稻幼苗上。成虫期的褐飞虱在水稻幼苗上产卵3 d，产卵后10-12 d孵出1龄若

虫，生长到2龄的若虫用于实验。

### **5.1.2** 实验试剂与抗体

二甲基甲酰胺（DMF）、荧光素粉、荧光抗衰减液购自Invitrogen公司；多聚甲醛、Triton-100、phalloidin–rhodamine购自Sigma公司；牛血清蛋白（BSA）、

NaHCO3购自厦门泰京公司；Protein A IgG purification kits购自Thermo公司；戊二醛、醋酸双氧铀和柠檬酸铅购自Alfa Aesar公司；LR gold包埋剂购自London Resin公司；Goat anti-Rabbit IgG-15nm胶体金购自British BioCell International 公

司；其他化学试剂均为国产分析纯。RRSV的外壳蛋白P10抗血清由本实验室制备保存。

## **5.2** 实验方法

### **5.2.1** 褐飞虱饲毒

选取一株感染RRSV的水稻病株，用纸包裹水稻根部的泥土后放入养虫笼中。抓取约200头1-2龄的无毒褐飞虱若虫，放在水稻病株上取食，若虫饲毒2 d后，将水稻病株取出，然后放入健康的水稻幼苗供褐飞虱若虫取食。在褐飞虱饲毒后的不同时间段各取50头虫子用于解剖消化系统。

### **5.2.2** 免疫荧光标记**RRSV**在褐飞虱消化系统的分布

为了明确RRSV在褐飞虱消化系统的侵染循回过程，在饲毒后的1、3、5、

6、9、12 d分别抓取50头褐飞虱，参照2.2.4和2.2.5方法在解剖镜下解剖褐飞虱消化系统，并使用virus-FITC抗体进行免疫荧光标记病毒，共聚焦显微镜下观察荧光。

### **5.2.3** **RRSV**编码非结构蛋白在**Sf9**细胞中的表达

#### **5.2.3.1** 构建**Sf9**表达载体

为了明确参与RRSV复制和组成病毒原质的组分，参照3.2.2的方法将RRSV编码的非结构蛋白Pns6、Pns7和Pns10与His或strep标签融合后的蛋白分别重组到pDEST-8载体上，获得pDEST8-Pns6-his、pDEST8-Pns7-his和pDEST8-Pns10-strep. 将重组质粒分别转化DH10Bac菌株获得重组穿梭质粒Bacmid-Pns6-His、Bacmid-Pns7-His和Bacmid-Pns10-strep. 重组穿梭质粒转染

Sf9细胞获得高浓度的重组杆状病毒侵染液。

#### **5.2.3.2** 免疫荧光标记**RRSV**非结构蛋白在**Sf9**细胞中的定位

参照3.2.2方法分别用表达Pns6-His、Pns7-His和Pns10-strep的重组杆状病毒侵染液侵染Sf9细胞，使用His-FITC和strep-rhodamine抗体标记Sf9细胞中表达的蛋白，共聚焦显微镜下观察荧光。

### **5.2.4** 电镜观察**Pns10**蛋白在褐飞虱唾液腺中的定位

为了检测RRSV编码的Pns10蛋白是否是病毒复制的场所，参照3.2.3.4方法对病毒侵染12 d的褐飞虱唾液腺分别进行常规电镜切片处理和免疫电镜切片处理，然后在电子显微镜下观察唾液腺中Pns10与病毒粒体的分布关系。

### **5.2.5** **dsPns10**对**RRSV**在昆虫体内复制的影响

按照3.2.5的方法将dsPns10和dsGFP分别与人工饲料混合，添加到饲喂装置一端的双层Parafilm M膜中间，同时以单独饲喂人工饲料为对照处理。1-2龄的无毒褐飞虱取食36 h后，将其分别转移到RRSV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻幼苗上饲养，饲毒后12 d，每个处理分别抓取100头褐飞虱，

参照3.2.5.6方法使用P8F/R和Pns10F/R引物进行RT-PCR检测每头虫体内的P8

和Pns10基因，分析饲喂dsPns10对褐飞虱带毒率的影响。

同时参照5.2.2方法对饲喂dsRNA的褐飞虱在饲毒后的3、6、9 d分别取50

头褐飞虱进行免疫荧光标记检测Pns10蛋白在褐飞虱消化系统的分布，分析干扰

Pns10蛋白的表达对RRSV在褐飞虱体内侵染的影响。

表5-1 本章中用到的引物

Table 5-1. Primers used in this study

| 引物（primer） | 引物序列（sequence） |
| --- | --- |
| Pns10-T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATA  GGGCGTGCAATTCCCGAACTTGT 3' |
| Pns10-T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGACCAGACCAATGTCGCTTGAC 3' |
| GFP-T7F | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGATGAGTAAAGGAGAAGAACTT 3' |
| GFP-T7R | 5' ATTCTCTAGAAGCTTAATACGACTCACTATAG  GGTTATTTGTATAGTTCATCCATG 3' |
| Pns6GF | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCA  TGCAGCTCTTCATAGTCAAACTTG 3' |
| Pns6-HisGR | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGA  TGATGATGATGATGATCAAGCTCCTTACATTCAGGT GC 3' |
| Pns7GF | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC  ATGGACGAGCTAACTTTATCCC3' |
| Pns7-HisGR | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGA  TGATGATGATGATGTCCCTCGACGGGAGGCCC3' |
| Pns10GF | 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCA  TGCCTTTCGTGCAATTCCC 3' |
| Pns10-strepGR | 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTA TTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTTCTGC  GTCATCACCAAAGTTA 3' |
| P8F | 5' CACTAATCCTATGATCCAGCGCC 3' |
| P8R | 5' TACACCGGAACCGCTGGCTT 3' |
| Pns10F | 5' CGTGCAATTCCCGAACTTGT 3' |
| Pns10R | 5' ACCAGACCAATGTCGCTTGAC 3' |

## **5.3** 结果与分析

### **5.3.1** **RRSV**在褐飞虱消化系统的侵染循回过程

使用phalloidin–rhodamine标记褐飞虱消化系统的Actin，通过共聚焦显微镜观察，可以明确褐飞虱消化系统由食道、前憩室、中肠、后肠和唾液腺组成。其中中肠从内到外分别是肠腔、单层上皮细胞、基底膜和肠道表面的肌肉组织，在

上皮细胞靠近肠腔一侧分布着大量的微绒毛，而中肠外表的肌肉组织则由环肌和纵肌组成（图5-1A）。

为了明确RRSV在褐飞虱消化系统的侵染过程，在病毒侵染后的不同时间段，将解剖获得的白背飞虱消化系统经过固定、渗透和抗体孵育，在共聚焦显微镜下观察病毒在褐飞虱消化系统的分布。实验中用virus-FITC抗体标记昆虫消化系统中的病毒，phalloidin–rhodamine标记昆虫消化系统的Actin。在褐飞虱饲毒后的1、3、4、6和9 d分别解剖50头褐飞虱，病毒在不同器官的分布如表5-2所示。饲毒1 d后，约50%的褐飞虱中肠肠腔内可以观察到病毒抗体，表明病毒通过食道进入了中肠肠腔（图5-1B）。饲毒3 d后，观察到病毒分布在约30%褐飞虱的少数中肠上皮细胞中，而肠腔内已观察不到病毒，表明少数病毒已侵入中肠上皮细胞并进行复制，其余的病毒被排出体外（图5-1C）。饲毒后4 d，观察到28%的褐飞虱中肠表面肌肉组织分布着大量的病毒（图5-1D），表明中肠上皮细胞内的病毒已跨过基底膜到达中肠表面的肌肉组织。饲毒后6 d，在褐飞虱的食道、前憩室、中肠、后肠和唾液腺均有病毒分布（图5-1E），并且病毒主要分布在中肠和后肠表面的肌肉上，而在上皮细胞内已不存在病毒（图5-1F-H），表明病毒已完全从中肠上皮细胞扩散到中肠外表，并向邻近的后肠、食道、前憩室和唾液腺扩散。饲毒后9 d，病毒已达到系统性侵染，大量病毒分布在中肠、后肠、食道、前憩室和唾液腺（图5-1I, J）。

以上结果表明，RRSV在褐飞虱体内首先侵染中肠的上皮细胞并进行复制，随后直接扩散到中肠表面的肌肉组织，并沿着肌肉组织扩散到其他器官，最后到达唾液腺，完成整个侵染循回过程。

表5-2. RRSV在褐飞虱消化系统的分布

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Organ a | No. positive insects with RRSV in different tissues (n=50) | | | |
| 3 days | 4 days | 6 days | 9 days |
| me | 15 | 18 | 0 | 0 |
| Vm-mg | 0 | 14 | 21 | 20 |
| hg | 0 | 0 | 14 | 20 |
| os | 0 | 7 | 19 | 20 |
| ad | 0 | 5 | 19 | 20 |
| sg | 0 | 0 | 13 | 18 |

Table 5-2. Occurrence of RRSV in digestive system of BPHs as detected by immunofluorescence microscopy

注：a：每个处理解剖50头褐飞虱；me：中肠上皮细胞；vm-mg：中肠表面肌肉；hg：后肠；os：食道；ad：前憩室；sg：唾液腺



图5-1. RRSV在褐飞虱消化系统的侵染途径

Fig. 5-1. Infection route of RRSV in the digestive system of BPHs.

A, The alimentary canal of BPH; B, Viral antigens accumulated in the alimentary canal of BPH

After feeding on RRSV infected plants. ad, anterior diverticulum; mg, midgut; hg, hindgut; mt, malpighian tubules; os, oesophagus; sg, salivary gland; me, midgut epithelium; mv, microvilli; vm, visceral muscle; Bars, 70µm.

### **5.3.2** **RRSV**非结构蛋白在**Sf9**细胞中的表达

呼肠孤病毒通常在寄主细胞内由其编码的非结构蛋白形成病毒原质进行复制。为了明确RRSV形成病毒原质的组分，本研究在Sf9细胞中分别表达了RRSV编码的3个非结构蛋白Pns6、Pns7和Pns10。免疫荧光标记结果显示：单独表达的Pns6主要分布在Sf9细胞膜上（图5-2A），单独表达的Pns7形成丝状结构伸出细胞膜，而单独表达的Pns10在细胞质中形成颗粒状的内含体，当Pns6和Pns10共表达时，两者发生共定位，在细胞质中形成颗粒状的内含体。这些结果表明RRSV编码的三个非结构蛋白中仅有Pns10可单独形成类似于病毒原质的结构，推测Pns10可以在RRSV侵染的寄主内通过自身互作形成病毒原质，同时Pns6和Pns10存在互作而发生共定位。



图5-2. RRSV编码的非结构蛋白在Sf9细胞中的定位

Fig. 5-2. Subcellular localization of non-struture proteins of RRSV in Sf9 cells.

A, Pns6-His (panel i), Pns7-His (panal ii) and Pns10-Strep (panal iii) were expressed in Sf9 cells; B, Pns10-Strep and Pns6-His were co-expressed in Sf9 cells. Bars, 5 mm.

### **5.3.3** **Pns10**在褐飞虱体内的定位

为了明确Pns10在病毒原质形成过程中的作用，本研究通过免疫荧光标记和免疫电镜技术检测了褐飞虱体内Pns10蛋白的分布。实验中virus-FITC标记病毒，Pns10-rhodamine标记Pns10蛋白，Alexa Fluor 647 carboxylic acid标记昆虫消

化系统的Actin。免疫荧光标记结果显示：RRSV侵染后3 d，褐飞虱中肠上皮细胞内的Pns10-rhodamine抗体共定位于virus-FITC抗体的颗粒状内含体上（图5-3A）；病毒侵染后6 d和9 d，分别在中肠表面肌肉组织和唾液腺中观察到Pns10与病毒发生共定位（图5-3B, C）。电子显微镜下观察到Pns10抗体特异性地结合在唾液腺中形成的病毒原质中（图5-4A），并且在病毒原质中存在直径约50 nm的未成熟病毒粒体，而在病毒原质外围可观察到直径约70 nm呈结晶状排列的成熟病毒粒体（图5-4B, C）。这些结果表明RRSV编码的Pns10蛋白是病毒原质基质的组分，并且证明病毒原质是病毒装配的场所。



图5-3. Pns10与病毒在RRSV侵染的褐飞虱体内发生共定位

Fig. 5-3. Pns10 antigens co-localize with viral antigens in BPHs infected with RRSV.

A, Pns10 antigens and viral antigens were distributed in the midgut epithelium at 3 days padp.; B, Pns10 antigensand viral antigens were distributed in the visceral muscle tissues surrounding the midgut at 6 days padp.; C, Pns10 antigens and viral antigens were distributed in the salivary

Glands at 9 days padp.; DIC, Differential interference contrast; me, midgut epithelium; mg, midgut, sg, salivary gland; vm, visceral muscle. Bars, 70µm



图5-4. Pns10是形成病毒原质基质的组分

Fig. 5-4. RRSV Pns10 is the component of the viroplasm matrix.

A, immunogold labelling of RRSV Pns10 in the viroplasm matrix in infected salivary glands.

Black arrows indicate virus particles, white arrows indicate gold particles. B and C, morphogenesis of RRSV particles associated with the viroplasm matrix in infected salivary glands.

Black arrows indicate core-like particles, whilst white arrows indicate intact viral particles. VP, viroplasm. Bars, 200 nm.

### **5.3.4** **Pns10**参与**RRSV**在褐飞虱体内的侵染和复制

为了验证Pns10蛋白是否参与RRSV在褐飞虱体内的侵染，本研究通过膜饲喂的方法分别用混合人工饲料的dsPns10、dsGFP以及单独人工饲料饲喂1-2龄的褐飞虱若虫1d，接着在RRSV侵染的水稻病株上饲毒2 d，然后转到健康水稻上饲养。饲毒后9 d，分别抓取100头褐飞虱，通过RT-PCR检测褐飞虱的带毒率。检测结果显示单独饲喂人工饲料或饲喂dsGFP的褐飞虱带毒率相近，平均带毒率分别为39.7%和38.3%，而饲喂dsPns10的褐飞虱带毒率仅为11.7%，显著低于对照组（表5-3），表明饲喂dsPns10抑制RRSV在介体褐飞虱体内的侵染。

同时在饲毒后的3、6、9 d分别抓取50头虫子，用于观察RRSV在褐飞虱消化系统中的侵染情况。检测结果如表5-3所示，饲毒后3 d，约30%饲喂dsGFP的褐飞虱的少数上皮细胞中能检测到病毒和Pns10蛋白，而仅有10%饲喂dsPns10的褐飞虱的少数上皮细胞中可检测到病毒和Pns10蛋白，表明dsPns10特异性干扰了Pns10蛋白的表达并显著地抑制了早期RRSV对昆虫中肠上皮细胞的初侵染。饲毒后6 d，约40%饲喂dsGFP的褐飞虱中肠表面肌肉组织可以观察到病毒和Pns10蛋白的分布，中肠上皮细胞内已没有病毒和Pns10蛋白的分布，同时26%的褐飞虱体内病毒已扩散到后肠，20%的褐飞虱体内病毒已扩散到唾液

腺；而饲喂dsPns10的处理组仅有12%的褐飞虱体内观察到病毒和Pns10蛋白的分布，且上皮细胞内仍有病毒和Pns10蛋白分布，其中约6%的褐飞虱唾液腺中检测到病毒和Pns10蛋白，表明dsPns10诱导的RNAi可以抑制病毒的复制从而延缓病毒从中肠上皮细胞向外扩散。饲毒后9 d，36%饲喂dsGFP的褐飞虱体内病毒广泛分布在唾液腺；然而仍然仅有6%饲喂dsPns10的褐飞虱唾液腺中检测到病毒和Pns10蛋白；表明dsPns10诱导的RNAi抑制了病毒在昆虫体内的扩散。实验过程中病毒在饲喂人工饲料的褐飞虱消化系统的侵染情况与饲喂dsGFP的相近。以上结果表明干扰病毒原质组分Pns10蛋白的表达可以抑制RRSV在褐飞虱消化系统的复制并延缓病毒的扩散，从而进一步证明Pns10蛋白参与RRSV在介体昆虫体内的复制，是病毒复制的关键因子。

表5-3 饲喂dsPns10抑制RRSV在褐飞虱消化系统的侵染

Table 5-3. Ingestion of dsPns10 stongly inhibits virus infection in the digestive system of BPHs

| Treatment | No. of insects positive for  Pns10 and P8 (n=100) a | | | No. of insects positive for virus and Pns10 in  Different tissues (n=50) b | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | I | II | III |  | days | me | vm-mg | vm-hg | sg |
| dsPns10 | 10 | 13 | 12 |  | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 |
|  |  |  |  |  | 6 | 6 | 6 | 4 | 3 |
|  |  |  |  |  | 9 | 0 | 7 | 6 | 3 |
| dsGFP | 37 | 40 | 38 |  | 3 | 15 | 0 | 0 | 0 |
|  |  |  |  |  | 6 | 0 | 18 | 13 | 10 |
|  |  |  |  |  | 9 | 0 | 20 | 20 | 18 |
| CK | 40 | 38 | 41 |  | 3 | 16 | 0 | 0 | 0 |
|  |  |  |  |  | 6 | 0 | 21 | 14 | 11 |
|  |  |  |  |  | 9 | 0 | 19 | 19 | 17 |

a: RT-PCR检测每头白背飞虱体内的Pns10和P8基因，每个处理检测100头褐飞虱；b：免疫荧光标记每头昆虫体内的病毒抗体褐Pns10抗体，每个处理解剖50头褐飞虱。me：中肠上皮细胞；vm-mg：中肠表面肌肉；vm-hg：后肠表面肌肉；sg：唾液腺

## **5.4** 讨论

本研究通过对RRSV在褐飞虱消化系统侵染循回过程的系统分析，明确了

RRSV首先进入中肠肠腔，接着从肠腔侵入中肠上皮细胞并进行复制，随后直接扩散到中肠表面，病毒在中肠表面复制并沿着肌肉组织向其他器官扩散，最后扩散到唾液腺，完成整个侵染循回过程。病毒从中肠肠腔侵入中肠上皮细胞的过程中，仅有约30%褐飞虱的少数上皮细胞被侵染，表明病毒在侵入中肠上皮细胞的过程中面临着中肠侵入屏障的阻挡，导致大量的病毒被阻挡在中肠肠腔内并被排出体外。在上皮细胞中复制的病毒没有向邻近的细胞扩散，而是直接跨过基底膜向中肠表面扩散。在中肠表面病毒沿着环肌和纵肌向其他器官扩散。饲毒后 6

d，部分昆虫的唾液腺中已存在病毒，表明病毒已完成循回期，与早期对RRSV

在褐飞虱体内的最短循回期的研究结果一致（谢联辉和林奇英，1980）。

呼肠孤病毒科病毒通常由非结构蛋白形成病毒原质，形成病毒原质的蛋白均可在非寄主细胞Sf9中形成类似于病毒原质的内含体，如RBSDV和MRCV分别编码的P9-1蛋白（Akita *et al*., 2012; Maroniche *et al*., 2010），以及轮状病毒编码的NS2蛋白（Kumar *et al*., 2007）。本研究在非寄主昆虫细胞Sf9中表达了RRSV编码的三个非结构蛋白Pns6、Pns7和Pns10，然而仅有Pns10可以单独形成类似于病毒原质的内含体，表明Pns10是形成病毒原质基质的组分。Pns6单独表达定位在细胞膜上，与其在非寄主植物本氏烟中具有运动蛋白功能而定位在细胞膜上的结果相吻合（Wu *et al*., 2010a）。然而当Pns6和Pns10在Sf9细胞中共表达时，由于两者存在互作而发生共定位，结合Pns6具有核酸结合能力的特征（Shao *et al*., 2004），推测Pns6蛋白在病毒原质形成过程中通过与Pns10的互作被招募到病毒原质中，参与病毒的复制和装配。本研究通过免疫荧光标记和免疫电镜切片技术进一步明确了RRSV侵染褐飞虱唾液腺所形成的病毒原质是由Pns10蛋白组成，而且在RRSV形成的病毒原质中同时存在核心病毒粒体和成熟的病毒粒体，证明了病毒原质是病毒装配的场所。

RNAi作为由dsRNA诱导的序列特异性的基因沉默机制已成为一种重要的工具用于植物呼肠孤病毒基因功能的研究（Jia *et al*., 2012b）。由于Pns10是形成病毒原质所必须的组分，本研究通过膜饲喂法摄取dsRNA干扰Pns10蛋白的表达显著降低了褐飞虱对RRSV的带毒率，同时带毒昆虫体内病毒的扩散也受到了明显的抑制，由此证明干扰Pns10蛋白的表达将阻碍病毒原质的形成，抑制病毒在昆虫体内的复制和装配，从而有效地阻碍了病毒的侵染和扩散。RRSV编码的Pns10蛋白与SRBSDV编码的P9-1蛋白具有相同的功能（Jia *et al*., 2012b，

2012c），与之类似的还有轮状病毒的病毒原质组分NS2蛋白。通过siRNA干扰

NS2蛋白的表达，可以抑制病毒原质的形成、基因组的复制、病毒粒体的装配等

（Silvestri *et al*., 2004）。近年来的研究发现通过RNAi原理建立的转基因水稻干扰RBSDV、RDV 和RGDV 病毒原质蛋白的表达能够强烈地抵抗病毒的侵染

（Shimizu *et al*., 2011, 2009, 2012），表明病毒原质在呼肠孤病毒的复制及侵染过程中起着至关重要的作用。因此，可以通过转基因水稻以形成病毒原质的Pns10蛋白为靶标用于水稻齿叶矮缩病毒病的防治。

# 全文小结与展望

本论文以近年来我国水稻种植区普遍发生的水稻病毒为研究对象，系统地分析了SRBSDV和RRSV在介体飞虱体内的侵染机理。具体研究结论为：

1. 通过免疫荧光标记技术系统分析了SRBSDV在其介体昆虫体内的侵染循回过程。明确了SRBSDV在白背飞虱取食过程中首先进入中肠肠腔；随后少量的病毒粒体侵入中肠上皮细胞并进行复制；增殖后的病毒从中肠上皮细胞向中肠表面的肌肉组织扩散；病毒在中肠表面沿着环肌和纵肌向邻近的器官扩散；同时SRBSDV通过血淋巴扩散到唾液腺，并在唾液腺中大量增殖，从而完成整个侵染循回过程。此外，明确了SRBSDV受到灰飞虱中肠释放屏障的阻碍无法扩散到唾液腺，从而不能被灰飞虱有效传播。

2. 通过免疫荧光标记P9-1蛋白在非寄主和寄主细胞中的定位，明确了SRBSDV编码的P9-1蛋白是形成病毒原质基质的组分之一，形成的病毒原质是SRBSDV进行病毒RNA复制和病毒粒体装配的场所。应用RNAi技术干扰P9-1蛋白在介体培养细胞中的表达，能显著抑制病毒原质的形成和病毒在细胞中的侵染，明确P9-1蛋白参与病毒的复制。通过膜饲喂法饲喂人工合成的P9-1基因dsRNA，能抑制SRBSDV在白背飞虱体内的侵染和复制，并阻碍白背飞虱有效传播SRBSDV。明确了P9-1蛋白是SRBSDV在介体昆虫体内有效侵染和复制所必需的，同时确定P9-1可作为靶标基因用于制备抗病毒的转基因水稻。

3. 应用免疫荧光标记技术和电子显微镜技术明确了SRBSDV编码的非结构蛋白P7-1在白背飞虱培养细胞和昆虫体内形成包裹着病毒粒体的管状结构；通过病毒抗体中和实验和RNAi实验证实P7-1蛋白形成的管状结构参与病毒在培养细胞中的胞间扩散；根据P7-1管状结构在白背飞虱体内的分布，明确病毒借助P7-1管状结构在白背飞虱体内的扩散突破各种侵染屏障，从而实现病毒在昆虫体内的快速扩散；应用酵母双杂交和免疫共沉淀技术证明P7-1与肌动蛋白

（Actin）存在特异性互作，认为P7-1管状结构通过与肌动蛋白的互作实现在消化道表面的快速扩散；应用膜饲喂法饲喂人工合成的针对P7-1基因的dsRNA，能够阻碍病毒在白背飞虱体内的扩散，最终阻碍了白背飞虱传播SRBSDV的能力，表明SRBSDV P7-1是病毒在白背飞虱体内有效扩散所必需的。

4. 通过免疫荧光标记技术明确了RRSV在褐飞虱体内的侵染循回途径，其与SRBSDV在白背飞虱体内的侵染循回途径大体相似。通过免疫荧光标记和电子显微镜技术明确RRSV编码的非结构蛋白Pns10是形成病毒原质的组分之一；应用膜饲喂体外合成的针对Pns10基因的dsRNA，显著抑制了RRSV在褐飞虱体内的侵染和复制，证明Pns10蛋白是RRSV在介体褐飞虱体内侵染和复制所必需的。

本研究的创新点为：

1. 首次阐明了SRBSDV和RRSV在不同飞虱体内的侵染循回过程；

2. 首次将RNAi技术与介体昆虫培养细胞相结合研究植物病毒编码蛋白的功能，明确了SRBSDV非结构蛋白P9-1和RRSV非结构蛋白Pns10是形成病毒原质基质的组分，参与病毒在介体内的复制；

3. 首次明确SRBSDV编码的非结构蛋白P7-1是形成包裹病毒粒体的管状结构的组分，并证明P7-1管状结构参与病毒在介体昆虫培养细胞和昆虫体内的扩散；

4. 初步解析了SRBSDV和RRSV适应于相应介体昆虫高效传毒的分子机制，明确了病毒原质组分蛋白在病毒侵染过程中的重要作用，为利用RNAi原理培育转基因水稻防治病毒病的发生提供了靶标基因及理论依据。

展 望

持久增殖型病毒在介体昆虫消化系统的侵染包括识别侵入、复制、装配和扩散等过程，而且病毒在介体内的侵染过程需要介体昆虫的蛋白参与完成。目前关于SRBSDV侵入白背飞虱体内的机制还不清楚，还不明确哪些介体因子参与了病毒侵染的过程。为了进一步深入认识病毒与介体之间的互作关系，我们还需从以下几方面继续研究：

1. 病毒与不同的介体昆虫存在亲和性识别差异，主要反映在病毒是否能够侵染介体。因此通过电镜技术研究SRBSDV的侵入机理，鉴定参与病毒侵入过程的昆虫中肠表面受体蛋白，将进一步揭示病毒与介体的亲和性差异机理；

2. 持久增殖型病毒在介体昆虫体内的增殖必然受到介体防御反应的抵抗，如昆虫的RNAi机制。SRBSDV能够在白背飞虱体内大量地增殖，又不会导致介体的死亡，表明病毒与介体间已建立了平衡关系。研究昆虫天然免疫系统在病毒侵染过程中的作用方式，将有利于明确病毒突破寄主先天性免疫屏障的机理；

3. 病毒在介体内的增殖和扩散过程同样需要介体因子的参与，筛选和鉴定在病毒侵染过程中起重要作用的介体因子，将进一步明确病毒在介体昆虫体内侵染的分子机制。

参考文献

[1].王毅. 2007. 白背飞虱的生物学特性[J]. 农技服务, 1: 45-46.

[2]. 卢嫣红, 张金凤, 熊如意, 徐秋芳, 周益军. 2011. 南方水稻黑条矮缩病毒 S6 编码一个沉默抑制子[J]. 中国农业科学, 44(14): 2909-2917.

[3]. 朱俊子, 周倩, 崔亚, 高必达. 2012. 南方水稻黑条矮缩病毒的新的自然寄主[J]. 湖南农业大学学报（自然科学版）, 38(1): 58-60.

[4]. 全国白背飞虱科研协作组. 1981. 白背飞虱迁飞规律的初步研究[J]. 中国农业科学, 5: 25- 31.

[5]. 刘万才, 刘宇, 郭荣. 2010. 南方水稻黑条矮缩病发生现状及防控对策[J]. 中国植保导报, 30(3): 17-18.

[6]. 刘瑛. 2011. 两种植物呼肠孤病毒的小关蛋白鉴定及其功能结构域研究[D]. 福州: 福建农林大学.

[7]. 吴美爱. 2008. 水稻齿叶矮缩病毒三个分离物S6-S10片段的基因结构特征分析[D]. 福州: 福建农林大学.

[8]. 吴维, 毛倩卓, 陈红燕, 陈倩, 刘启飞, 李凡, 魏太云. 2012. 应用免疫荧光技术研究水稻条纹病毒（RSV）侵染介体灰飞虱卵巢的过程[J]. 农业生物技术学报, 20(12): 1457-1462.

[9]. 沈君辉, 尚金梅, 刘光杰. 2003. 中国的白背飞虱研究概况[J]. 中国水稻科学, 17(增刊): 7-22.

[10]. 沈慧梅. 2010. 我国褐飞虱和白背飞虱的境外虫源研究[D]. 南京: 南京农业大学.

[11]. 张灿东. 1980. 我省发现水稻锯齿叶矮缩病[J]. 江西农业科学, 11: 13.

[12]. 张松柏, 彭兆普, 刘勇, 张德咏, 成飞雪, 马明勇. 2010. 2009 年湖南省南方水稻黑条矮缩病暴发原因初步分析[J]. 植物保护, 36(6): 121-124.

[13]. 张蔚明, 刘燕娟, 周倩, 廖晓兰. 2011. 南方水稻黑条矮缩病毒外壳蛋白 P10 的原核表达和抗血清制备及应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 37(4): 400-402.

[14]. 张寰, 张永安, 秦启联, 王玉珠, 曲良建, 李瑄, 苗麟, 殷珍仙, 张爱君, 温发园. 2007. 昆虫细胞系的培养和建立技术[J]. 昆虫学报, 50(8): 834-839.

[15]. 邵朝纲. 2004. 水稻齿叶矮缩病毒的分子生物学研究及新城疫病毒检测新技术[D]． 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院).

[16]. 林奇英, 谢联辉, 谢莉妍, 吴祖建, 周仲驹. 1993. 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[J]. 农业科学集刊, (1): 203-206.

[17]. 林奇英, 谢联辉, 谢莉妍, 周仲驹, 宋秀高. 1991. 水稻条纹叶枯病的研究 II. 病害的症状和传播[J]. 福建农学院学报, 21(1): 24-28.

[18]. 欧高财, 易光辉, 郭海明, 任凡, 张政兵, 郑和斌. 2012. 南方水稻黑条矮缩病对水稻产量损失及测报因子的初步研究[J]. 植物保护, 38(3): 125-127.

[19]. 周国辉, 张曙光, 邹寿发, 许兆伟, 周志强. 2010. 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[J]. 植物保护, 36(1): 144-146.

[20]. 周国辉, 温锦君, 蔡德江, 李鹏, 许东林, 张曙光. 2008. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种: 南方水稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通报, 53(20): 2500-2508.

[21]. 周剑雄. 2010. 鲍铁蛋白、血蓝蛋白原核表达及多克隆抗体制备、纯化[D]. 福州: 福建农林大学.

[22]. 周亮高. 1980. 广东发现的齿叶矮缩病[J]. 植物保护, 6(4): 1-2.

[23]. 郑爱玲. 2012. 南方水稻黑条矮缩病毒在其介体白背飞虱体内的复制[D]. 福州: 福建农

林大学.

[24]. 郑璐平, 谢荔岩, 连玲丽, 谢联辉. 2008. 水稻齿叶矮缩病毒的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 10(5): 8-12.

[25]. 郭年梅, 韩庆梅, 毛倩卓, 贾东升, 魏太云. 2012. 水稻齿叶矮缩病毒非结构蛋白 Pns7 形成伸出昆虫细胞膜的纤维丝状结构[OL]. 中国论文科技在线, [http: //www. paper. edu. cn/](http://www.paper.edu.cn/) releasepaper/content/201212-472.

[26]. 郭灵芳, 张长青, 鲁红学, 周焱, 徐章逸, 章松柏. 2010. 一种简单快速的食用菌病毒dsRNA提取方法[J]. 实验技术与管理, 27(12): 51-53, 57.

[27]. 郭荣, 周国辉, 张曙光. 2010. 水稻南方黑条矮缩病发生规律及防控对策初探[J]. 中国植保导刊, 30(8): 17-20.

[28]. 曹杨, 潘峰, 周倩, 李冠华, 刘双清, 黄志农, 李有志. 2011. 南方水稻黑条矮缩病毒介体昆虫白背飞虱的传毒特性[J]. 应用昆虫学报, 48(5): 1314-1320.

[29]. 彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 梁文广, 宋敦伦. 2002. 普通昆虫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社. 106-121.

[30]. 蒋德春, 杨洪, 金道超. 水稻矮缩病媒介昆虫及其传毒机制的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(5): 73-77.

[31]. 曾江勇, 郭建宏, 刘在新. 2006. 负链RNA病毒的反向遗传技术[J]. 动物医学进展, 27(9): 35-39.

[32]. 谢联辉, 林奇英, 郭景荣. 1982. 传带水稻矮缩病毒的二点黑尾叶蝉[J]. 福建农业科技, (3): 24, 50.

[33]. 谢联辉, 林奇英. 1980. 锯齿叶矮缩病毒在我国水稻上的发现. 植物病理学报, 10(1): 59-64.

[34]. 谢联辉, 林奇英. 2004. 植物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社. 27-29.

[35]. 谢联辉, 周仲驹, 林奇英, 宋秀高, 谢莉妍. 1991. 水稻条纹叶枯病的研究Ⅲ: 病害的病原性质[J]. 福建农学院学报, 20(2): 144-149.

[36]. 翟保平, 周国辉, 陶小荣, 陈晓, 沈慧梅. 2011. 稻飞虱暴发与南方水稻黑条矮缩病流行的宏观规律和微观机制[J]. 应用昆虫学报, 48(3): 480-487.

[37]. 戴兆基. 2012. RNA 干扰介导的抗南方水稻黑条矮缩病毒研究[D]. 福州: 福建农林大学.

[38]. Adelman ZN, Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Carlson JO, Travanty EA, Carlson JO, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. 2002. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted repeat RNA derived from the virus genome [J]. J Virol. 76(24): 12925-12933.

[39]. Akita F, Higashiura A, Shimizu T, Pu Y, Suzuki M, Uehara-Ichiki T, Sasaya T, Kanamaru S, Arisaka F, Tsukihara T, Nakagawa A, Omura T. 2012. Crystallographic analysis reveals octamerization of viroplasm matrix protein P9-1 of Rice black streaked dwarf virus [J]. J Gen Virol. 86(2): 746-756.

[40]. Akita F, Miyazaki N, Hibino H, Shimizu T, Higashiura A, Uehara-Ichiki T, Sasaya T, Tsukihara T, Nakaqawa A, Iwasaki K, Omura T. 2011. Viroplasm matrix protein Pns9 from rice gall dwarf virus forms an octameric cylindrical structure [J]. J Gen Virol. 92(9): 2214-2221.

[41]. Amdam GV, Simoes ZL, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW. 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA [J]. BMC Biotechnology, 3: doi: 10.1186/1472-6750-3-1.

[42]. Ammar E-D, Gomez-Luengo RG, Gordon DT, Hogenhout SA. 2005. Characterization of

Maize Iranian mosaic virus and comparison with Hawaiian and other isolates of Maize mosaic virus (Rhabdoviridae) [J]. J Phytopathol. 153(3): 129-136.

[43]. Ammar E-D, Hogenhout SA. 2008. A neurotropic route for Maize mosaic virus (Rhabdoviridae) in its planthopper vector Peregrinus maidis [J]. Virus Res. 131(1): 77-85.

[44]. Ammar E-D, Nault LR. 2002. Virus transmission by leafhoppers, planthoppers and treehoppers (Auchenorrhyncha, Homoptera) [J]. Adv Bot Res. 36: 141-67.

[45]. Ammar E-D, Tsai CW, Whitfield AE, Redinbaugh MG, Hogenhout SA. 2009. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactins with insect and plant hosts [J]. Annu Rev Entomol. 54: 447-468.

[46]. Ammar E-D. 1994. Propagative transmission of plant and animal viruses by insects: Factors affecting vector specificity and competence [J]. Adv Dis Vector Res. 10: 289-332.

[47]. Assis Filho FMd, Naidu RA, Deom CM, Sherwood JL. 2002. Dynamics of tomato spotted wilt virus replication in the alimentary canal of two thrips species [J]. Phytopathology, 92(7): 729-33.

[48]. Astray RM, Jorqe sa, Lemos MA, Yokomizo AY, Boldorini VL, Puqlia AL, Ribeiro OG, Pereira CA. 2013. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in Drosophila melanogaster S2 cell populations [J]. Cytotechnology, (Epub ahead of print).

[49]. Ballut L, Drucker M, Pugniere M, Cambon F, Blanc S, Roquet F, Candresse T, Schmid HP, Nicolas P, Gall OL, Badaoui S. 2005. HcPro, a multifunc-tional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities [J]. J Gen Virol. 86(9): 2595-2603.

[50]. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 116(2): 281-297.

[51]. Bernard AR, Kost TA, Overton L, Caveqn C, Young J, Bertrand M, Yahia-Cherif Z, Chabert C, Mills A. 1994. Recombinant protein expression in a drosophila cell line: comparison with the baculovirus system [J]. Cytotechnology, 15(1-3): 139-144.

[52]. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. Nature, 409(6818): 363-366.

[53]. Boonsanay V, Smith DR. 2007. Entry into and production of the Japanese encephalitis virus from C6/36 cells [J]. Intervirology, 50(2): 85-92.

[54]. Brault V, Bergdoll M, Mutterer J, Prasad V, Pfeffer S, Erdinger M, Richards KE, Ziegler-Graff

V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission [J]. J Virol. 77(5):

3247-3256.

[55]. Brault V, Herrbach E, Reinbold C. 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids [J]. Micron. 38(3): 302-312.

[56]. Brault V, Mutterer J, Scheidecker D, Simonis MT, Herrbach E, Richards K, Ziegler-Graff V. 2000. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids [J]. J Virol. 74(3): 1140-1148.

[57]. Brault V, van den Heuvel JF, Verbeek M, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, Herrbach E, Garaud JC, Guilley H, Richards K, Jonard G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74 [J]. EMBO J. 14(4): 650-659.

[58]. Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG. 1990. Geminivirus coat protein replacement alters insect specificity [J]. Virology 177(1): 85-94.

[59]. Broering TJ, Arnold MM, Miller CL, Hurt JA, Joyce PL, Nibert ML. 2005. Carboxyl-proximal regions of reovirus non-structural protein muNS necessary and sufficient for forming factory -like inclusions [J]. J Virol. 79(10): 6194-6206.

[60]. Broering TJ, Parker JSL, Joyce PL, Kim J, Nibert ML. 2002. Mammalian reovirus nonstructural protein mNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells [J]. J Virol. 76(12): 8285-8297.

[61]. Brookes SM, Hyatt AD, Eaton BT. 1993. Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells [J]. J Gen Virol. 74(3): 525-530.

[62]. Caciagli P, Medina Piles V, Marian D, Vecchiati M, Masenga V, Mason G, Falcioni T, Noris E. 2009. Virion stability is important for the circulative transmission of tomato yellow leaf curl sardinia virus by Bemisia tabaci, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility [J]. J Virol. 83(11): 5784-5795.

[63]. Carrington J C, Ambros V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal deveIopment. Science, 301(5631): 336-338.

[64]. Chen AY, Walker GP, Carter D, Ng JC. 2011b. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 108(40): 16777-18782.

[65]. Chen H, Chen Q, Omura T, Uehara-Ichiki T, Wei T. 2011a. Sequential infection of Rice dwarf virus in the internal organs of its insect vector after ingestion of virus [J]. Virus Res. 160(1-2): 389-394.

[66]. Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Chen J, Zhang W. 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Insect Mol Biol. 19(6): 777-786.

[67]. Chen Q, Chen H, Mao Q, Liu Q, Shimizu T, Uehara-Ichiki T, Wu Z, Xie L, Omura T, Wei T. 2012. Tubular structure induced by a plant virus facilitates viral spread in its vector insect [J]. PLoS Pathog. 8(11): e1003032.

[68]. Chien LT, Zhang ZR, Hartzell HC. 2006. Single CI-channels activated by Ca2+ in Drosophila S2 cells are mediated by bestrophins [J]. J Gen Physiol. 128(3): 247-259.

[69]. Chu JJ, Leong PW, Ng ML. 2006. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into Aedes albopictus mosquito (C6/36) cells [J]. Virology, 349(2): 463-475.

[70]. de Assis Filho FM, Naidu RA, Deom CM, Sherwood JL. 2002. Dynamics of tomato spotted wilt virus replication in the alimentary canal of two thrips species [J]. Phytopathology, 92(7): 729-733.

[71]. Denison MR. 2008. Seeking Membranes: Positive-strand RNA virus Replication Complexes [J]. PLoS Biol. 6(10): e270.

[72]. Dong X, Zhai Y, Zhang J, Sun Z, Chen J, Chen J, Zhang W. 2011. Fork head transcription factor is required for ovarian mature in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. BMC Mol Biol. 12: doi: 10.1186/1471-2199-12-53.

[73]. Drucker M, Froissart R, Hebrard E, Uzest M, Ravallec M, Espérandieu P, Mani JC, Pugnière M, Roquet F, Fereres A, Blanc S. 2002. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of Cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector

[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 99(4): 2422-2427.

[74]. Du PV, Cabunagan RC, Cabauatan PQ, Choi HS, Choi IR, Chien HV, Huan NH. 2007. Yellowing syndrome of rice: etiology, current status, and future challenges [J]. Omonrice, 15: 94-101.

[75]. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, Bienz K. 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis [J]. J Virol. 74(14): 6570-6580.

[76]. Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation [J]. J Gen Virol. 85(3): 625-634.

[77]. Engelhard EK, Kam-Morsan LNW, Washburn JO, Volkman LE. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 91(8): 3224-27.

[78]. Falk BW, Tsai JH. 1985. Serological detection and evidence for multiplication ofMaize mosaic virus in the planthopper, *Peregrinus maidis* [J]. Phytopathology, 75(7): 852-55.

[79]. Fields BN, Raine CS, Baum SG. 1971. Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: defects in viral maturation as studied by immunofluorescence and electron microscopy [J]. Virology, 43(3): 569-578.

[80]. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-strandedRNAin Caenorhabditis elegans [J]. Nature, 391(6669): 806-811.

[81]. Froissart R, Michalakis Y, Blanc S. 2002. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses [J]. Phytopathology, 92(6): 576-579.

[82]. Fu Q, Zhang Z, Hu C, Lai F, Sun Z. 2001. A chemically defined diet enables continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) [J]. Appl Entomol Zool. 36 (1): 111-116.

[83]. Garret A, Kerlan C, Thomas D. 1996. Ultrastructural study of acquisition and retention of potato leaf roll luteovirus in the alimentary canal of its aphid vector, *Myzus persicae Sulz* [J]. Arch Virol. 141(7): 1279-1292.

[84]. Ghosh A, John VT. 1980. Rice ragged stunt virus disease in India [J]. Plant Disease, 64(11): 1032-1033.

[85]. Gomes-Leal W, Martins LC, Diniz JAP, Dos Santos ZA, Borges JA, Macedo CA, Medeiros AC, De Paula LS, Guimaraes JS, Freire MA, Vasconcelos PF, Picanco-Diniz CW. 2006. Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice [J]. Acta Tropica. 97(2): 126-139.

[86]. Goytia E, Fernández -Calvino L, Martníez -GarcaíB, López -Abella D, López -Moya JJ. 2006. Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system [J]. J Gen Virol. 87(11): 3413-23.

[87]. Grace TD. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro [J]. Nature, 195: 788-789.

[88]. Guo S, Kemphues K J. 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. Cell, 81(4): 611-620.

[89]. Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SL. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain [J]. Science, 297(5590):

2232-2237.

[90]. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2002. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells [J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296.

[91]. Hannon GJ. RNA interference. Nature, 418(6894): 244-251.

[92]. Harris KF. 1992. Advances Disease Vector Research [M]. New York: Springer-Verlag, 9: 313-41.

[93]. Hibi T, Omura T, Saito Y. 1984. Double-stranded RNA of Rice gall dwarf virus [J]. J Gen Virol. 65: 1585-1590.

[94]. Hibino H, Saleh N, Roechan M. 1979. Reovirus-like particles associated with rice ragged stunt diseased rice and insect vector cells [J]. Ann Phytopath Soc Japan. 45: 228-239.

[95]. Hogenhout SA, Ammar el-D, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted virus [J]. Annu Rev Phytopathol. 46: 327-359.

[96]. Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses [J]. J gen virol. 40(3): 531-543.

[97]. Inceoglu AB, Kamita SG, Hinton AC, Huang Q, Severson TF, Kang K, Hammock BD. 2001. Recombinant baculoviruses for insect control [J]. Pest Manag Sci. 57(10): 981-987.

[98]. Isogai M, Uyeda I, Lee BC. 1998. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10 [J]. J Gen Virol. 79(6): 1487-1494.

[99]. Jia D, Chen H, Mao Q, Liu Q, Wei T. 2012a. Restriction of viral dissemination from the midgut determines incompetence of small brown planthopper as a vector of Southern rice black-streaked dwarf virus [J]. Virus Res. 167(2): 404-408.

[100]. Jia D, Chen H, Zheng A, Chen Q, Liu Q, Xie L, Wu Z, Wei T. 2012b. Development of an insect vector cell culture and RNA interference system to investigate the functional role of fijivirus replication protein [J]. J Virol. 86(10): 5800-5807.

[101]. Jia D, Guo N, Chen H, Akita F, Xie L, Omura T, Wei T. 2012c. Assembly of the viroplasm by viral non-structural protein Pns10 is essential for persistent infection of rice ragged stunt virus in its insect vector [J]. J Gen Virol. 93(10): 2299-2309.

[102]. Jinek M, Doudna JA. 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference [J]. Nature, 457(7228): 405-412.

[103]. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2006. The Heliothis virescens cadherin protein expressed in Drosophila S2 cells functions as a receptor for Bacillus thuringiensis Cry1A but not Cry1Fa toxins [J]. Biochemistry, 45(32): 9688-9695.

[104]. Katayama S, Wei T, Omura T, Takagi J, Iwasaki K. 2007. Three-dimensional architecture of virus-packed tubule [J]. J Electron Microsc (Tokyo). 56(3): 77-81.

[105]. Kawano S, Shikata E, Senboku T. 1983. Purification and morphology of rice ragged stunt virus [J]. J Fac Agr Hokkaido Univ. 61(2): 209-218.

[106]. Kawano S, Uyeda I, Shikata E. 1984. Particle structure and double stranded RNA of rice ragged stuntvirus [J]. J Fac Agr Hokkaido Univ. 61(4): 408-418.

[107]. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowits EJ. 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses [M]. New York: Elsevier, 541-637.

[108]. Kobayashi T, Chappell JD, Danthi P, Dermody TS. 2006. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference [J]. J Virol. 80(18): 9053-9063.

[109]. Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle [J]. PLoS Biol.

5(9): e220.

[110]. Koyama K. 1988. Artificial rearing and nutritional physiology of the planthoppers and leafhoppers (Homoptera: Delphacidae and Deltocephalidae) on a holidic diet [J]. JARQ, 22: 20-27.

[111]. Kumar M, Jayaram H, Vasquez-Del Carpio R, Jiang X, Taraporewala ZF, Jacobson RH, Patton JT, Prasad BV. 2007. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity [J]. J Virol. 81(22): 12272-12284.

[112]. Lett JM, Granier M, Hippolyte I, Grondin M, Royer M, Blanc S, Reynaud B, Peterschmitt M. 2002. Spatial and temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus Cicadulina monitored by conventional and quantitative polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 92(1): 65-74.

[113]. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, 120(1): 15-20.

[114]. Li J, Chen Q, Lin Y, Jiang T, Wu G, Hua H. 2011. RNA interference in Nilaparvata lugens (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion [J]. Pest Manag Sci. 67(7): 852-859.

[115]. Li J, Xue J, Zhang HM, Yang J, Lv MF, Xie L, Meng Y, Li PP, Chen JP. 2013. Interactions between the P6 and P5-1 proteins of southern rice black-streaked dwarf fijivirus in yeast and plant cells [J]. Arch Virol. (Epub ahead of print).

[116]. Li X, Zhang M, Zhang H. 2011. RNA interference of four genes in adult Bactrocera dorsalis by feeding their dsRNAs [J]. PloS ONE, 6 (3): e17788.

[117]. Li Y, Cao Y, Zhou Q, Guo H, Ou G. 2012. The efficiency of Southern rice black-streaked dwarf virus transmission by the vector Sogatella furcifera to different host plant species [J]. Journal of Integrative Agriculture, 11(4): 621-627.

[118]. Link KC, Tiongco ER, Aguiero VM, Cabauatan PQ. 1978. Rice ragged stunt disease in Thilippines [J]. Philippine Phytopathology, 14(1-2): 38-57.

[119]. Link KC, Tiongco ER, Aguiero VM. 1978. Rice ragged stunt, a new virus disease (Nilaparvata lugens as insect vector) [J]. Plant Disease Reporter, 62(8): 701-705.

[120]. Liu HJ, Wei CH, Zhong YW, Li Y. 2007. Rice black-streaked dwarf virus outer capsid protein P10 has self-interactions and forms oligomeric com-plexes in solution [J]. Virus Res. 127(1): 34-42.

[121]. Liu S, Ding Z, Zhang C, Yang B, Liu Z. 2010. Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, Nilaparvata lugens [J]. Insect Biochem Mol Biol. 40(9): 666-671.

[122]. Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R. 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in Apis cerana using RNA interference [J]. Curr Microbiol. 61(5): 422-428.

[123]. Liu Y, Jia D, Chen H, Chen Q, Xie L, Wu Z, Wei T. 2011. The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells [J]. Arch Virol. 156(10): 1729-1736.

[124]. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 25(4): 402-408.

[125]. Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. Nat Biotechnol. 25(11): 1307-1313.

[126]. Maramorosch K. 1969. Viruses, Vectors and Vegetation [M]. New York: Interscience, 579-591.

[127]. Maroniche GA, Mongelli VC, Peralta AV, Distéfano AJ, Llauger G, Taboga OA, Hopp EH, del Vas M. 2010. Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts [J]. Virus Res. 152(1-2): 96-103.

[128]. Mathur M, Das T, Banerjee AK. 1996. Expression of L protein of Vesicular stomatists virus Indiana serotype from recombinant baculovirus in insect cells: requiremet of a host factor(s) for its biological activitv in vitro [J]. J Virol. 70(4): 2252-2259.

[129]. Modrof J, Lymperopoulos K, Roy P. 2005. Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies [J]. J Virol. 79(15): 10023-10031.

[130]. Morinaka T, Putta M, Chettanachit D, Pareiarearn A, Disthaporn S. 1983. Transmission (by*Nilaparvata lugens*) of rice ragged stunt disease (viroses) in Thailand [J]. JARQ. 17(2): 138-144.

[131]. Mrnoz M L, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A. 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells [J]. FEMS Microbiol Lett. 168(2): 251-258.

[132]. Mukherjee S, Hanley K A. 2010. RNA interference modulates replication of dengue virus in Drosophila melanogaster cells [J]. BMC Microbiol. 10: 127.

[133]. Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR. 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrthosiphonpisum* [J]. J Insect Sci. 6: 1-7.

[134]. Nagata T, Inoue-Nagata AK, Smid HM, Goldbach R, Peters D. 1999. Tissue tropism related to vector competence ofFrankliniella occidentalis for Tomato spotted wilt tospovirus [J]. J Gen Virol. 80(2): 507-515.

[135]. Nagata T, Inoue-Nagata AK, van Lent J, Goldbach R, Peters D. 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission ofTomato spotted wilt virus [J]. J Gen Virol. 83(3): 663-671.

[136]. Nagata T, Storms MM, Goldbach R, Peters D. 1997. Multiplication of tomato spotted wilt virus in primary cell cultures derived from two thrips species [J]. Virus Research, 49(1): 59-66.

[137]. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen RA. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. Plant Cell, 2(4): 279-289.

[138]. Nasu S. 1965. Electron microscopy studies on transovarial passage ofRice dwarf virus [J]. Jpn J Appl Entomol Zool. 9(3): 225-237.

[139]. Nault LR, Ammar E-D. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses [J]. Annu Rev Entomol. 34: 503-29.

[140]. Nault LR, Rodriguez JG. 1985. Leafhoppers and Planthoppers [M]. New York: Wiley, 121-162.

[141]. Nault LR. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis [J]. Ann Entomol Soc Am. 90: 522-541.

[142]. Ng JC, Falk B W. 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses [J]. Annu Rev Phytopathol. 44: 183-212.

[143]. Ng JC, Perry KL. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors [J]. Mol Plant Pathol. 5(5): 505-11.

[144]. Ohnishi J, Kniqht LM, Hosokawa D, Fujisawa I, Tsuda S. 2001. Replication of Tomato spotted wilt virus after ingestion by adult thrips setosus is restricted to midgut epithelial cells [J]. Phytopathology, 91(12): 1149-1155.

[145]. Olson KE, Carlson JO, Beaty BJ. 1992. Expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in Aedes albopictus (C6/36) cells using a non-infectious Sindbis virus expression vector [J]. Insect Mol Biol. 1(1): 49-52.

[146]. Omura T, Yan J, Zhong B, Wada M, Zhu Y, Tomaru M, Maruyama W, Kikuchi A, Watanabe Y, Kimural I, Hibino H. 1998. The P2 protein of rice dwarf phytoreovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector [J]. J Virol. 72(11): 9370-9373.

[147]. Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A, Fereres A. 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors [J]. J Gen Virol. 83(12): 3163-3171.

[148]. Parker JSL, Broering TJ, Kim J, Higgins DE, Nibert ML. 2002. Reovirus core protein m2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules [J]. J Virol. 76(9): 4483-4496.

[149]. Peters D, Black LM. 1970. Infection of primary culture of aphid cells with a plant virus [J]. Virology, 40(4): 847-853.

[150]. Plisson C, Drucker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, Bron P. 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein [J]. J Biol Chem. 278(26): 23753-23761.

[151]. Poncet D, Lindenbaum P, L'Haridon R, Cohen J. 1997. In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms [J]. J Virol. 71(1): 34-41.

[152]. Powell G, Tosh CR, Hardie J. 2006. Host plant selection by aphids: behavioral, evolu-tionary, and applied perspectives [J]. Annu Rev Entomol. 51: 309-330.

[153]. Price DRG, Gatehouse JA. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects [J]. Trends Biotechnol. 26(7): 393-400.

[154]. Pu L, Xie G, Ji C, Ling B, Zhang M, Xu D, Zhou G. 2012. Transmission characteristics of Southern rice black-streaked dwarf virus by rice planthoppers [J]. Crop Protection, 41: 71-76.

[155]. Pulmanausahakul R, Li J, Schnell MJ, Dietzschold B. 2008. The glycoprotein and the matrix protein of Rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread [J]. J Virol. 82(5): 2330-2338.

[156]. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation [J]. Cell, 123(4): 621-629.

[157]. Reynaud B, Peterschmitt M. 1992. A study of the mode of transmission of MSV by Cicadulina mbilausing an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Ann Appl Biol. 121: 85-94.

[158]. Roignant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C. 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila [J]. RNA, 9(3): 299-308.

[159]. Romoser WS, Wasieloski LP Jr, Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, Ludwig GV. 2004. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut [J]. J Med Entomol. 41(3): 467-75.

[160]. Ruiz-Ferrer V, Boskovic J, Alfonso C, Rivas G, Llorca O, López -Abella D, López -Moya JJ. 2005. Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid

Transmission [J]. J Virol. 79(6): 3758-3765.

[161]. Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. 2007. Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein [J]. Am J Trop Med Hyg. 77(2): 283-290.

[162]. Salas-Benito JS, del Angel RM. 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus [J]. J Virol. 71(10): 7246-7252.

[163]. Saleh MC, van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O΄Farrell PH, Andino R. 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing [J]. Nat Cell Biol. 8(8): 793-802.

[164]. Salonen A, Ahola T, Kaariainen L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes [J]. Curr Top Microbiol Immunol. 285: 139-173.

[165]. Schramm B, Locker JK. 2005. Cytoplasmic organization of POX virus DNA replication [J]. Traffic, 6(10): 839-846.

[166]. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways [J]. Mol Cell. 10(3): 537-548.

[167]. Shao CG, LüHJ, Wu JH, Gong ZX. 2004. Nucleic acid binding activity of pns6 encoded by genome segment 6 of rice ragged stunt oryzavirus. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) [J]. 36(7): 457-466.

[168]. Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Akita F, Uehara-Ichiki T, Omura T, Sasaya T. 2011. Immunity to Rice black streaked dwarf virus, a plantreovirus, can be achieved in rice plants by RNA silencing against the gene for the viroplasm component protein [J]. Virus Res. 160 (1-2): 400-403.

[169]. Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Akita F, Wei T, Sasaya T, Omura T, Uehara-Ichiki T. 2012. Hairpin RNA derived from the gene for Pns9, a viroplasm matrix protein of Rice gall dwarf virus, confers strong resistance to virus infection in transgenic rice plants [J]. J Biotechnol. 157(3): 421-427.

[170]. Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T, Sasaya T, Omura T. 2011. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to Rice stripe virus [J]. Plant Biotechnol J. 9(4): 503-512.

[171]. Shimizu T, Yoshii M, Wei T, Hirochika H, Omura T. 2009. Silencing by RNAi of the gene for Pns12, a viroplasm matrix protein of Rice dwarf virus, results in strong resistance of transgenic rice plants to the virus [J]. Plant Biotechnol J. 7(1): 24-32.

[172]. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms [J]. J Virol. 78(14): 7763-7774.

[173]. Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT. 2005. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell [J]. J Virol. 79(24): 15165-15174.

[174]. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. 1983. Production of human beta interaction in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. Molecular and cellular biology, 3(12): 2156-2165.

[175]. Stramer B, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, Martin P. Martin P. 2005. Live imaging of wound inflammation in Drosophila embryos reveals key roles for small

GTPases during in vivo cell migration [J]. J Cell Biol. 168(4): 567-573.

[176]. Su S, Liu Z, Chen C, Zhang Y, Wang X, Zhu L, Miao L, Wang XC, Yuan M. 2010. Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco [J]. Plant cell. 22(4): 1373-1387.

[177]. Supyani S, Hillman B, Suzuki N. 2007. Baculovirus expression of the 11 mycoreovirus-1 genome segments and identification of the guanylyltransferase-encoding segment [J]. J Gen Virol. 88(1): 342-350.

[178]. Tang B, Chen J, Yao Q, Pan Z, Xu W, Wang S, Zhang W. 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from Spodoptera exigua and its function identification through RNA interference [J]. J Insect Physiol. 56(7): 813-821.

[179]. Tao YJ, Ye Q. 2010. RNA Virus Replication Complexes [J]. PLoS Pathg. 6(7): 1-3.

[180]. Thomas CP, Booth TF, Roy P. 1990. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species [J]. J Gen Virol. 71(9): 2073-2083.

[181]. Todd JC, Ammar el-D, Redinbaugh MG, Hoy C, Hogenhout SA. 2010. Plant host range and leafhopper transmission of maize fine streak virus [J]. Phytopathology. 100(11): 1138-45.

[182]. Tomaru M, Maruyama W, Kikuchi A, Yan J, Zhu Y, Suzuki N, Isogai M, Oguma Y, Kimural I, Omura T. 1997. The loss of outer capsid protein P2 results in nontransmissibility by the insect vector of rice dwarf phytoreovirus [J]. J Virol. 71(10): 8019-8023.

[183]. Tonjes R R, Limbach C, Lower R, Kurth R. 1997. Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and manmalian cells [J]. J Virol. 71(4): 2747-2756.

[184]. Towers PR, Sattelle DB. 2002. A Drosophlia melanogaster cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels [J]. Bioessays, 24(11): 1066-1073.

[185]. Upadhyay SK, Chandrashekar K, Thakur N, Verma PC, Borgio JF, Singh PK, Tuli R. 2011. RNA interference for the control of whiteflies (Bemisia tabaci) by oral route [J]. J Biosci. 36(1): 153-161.

[186]. Upadhyaya NM, Ramm K, Gellatly JA, Li Z, Kositratana W, Waterhouse PM. 1997. Rice ragged stunt oryzavirus genome segments S7 and S10 encode non-structural proteins of M(r) 68, 025 (Pns7) and M(r) 32, 364 (Pns10) [J]. Arch Virol. 142(8): 1719-1726.

[187]. Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hebrard E, Garzo E, Candresse t, Fereres A, Blanc S. 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 104(46): 17959-17964.

[188]. van Cleef KW, van Mierlo JT, van den Beek M, van Rij RP. 2011. Identification of viral suppressors of RNAi by a reporter assay in Drosophila S2 cell culture [J]. Methods Mol Biol. 721: 201-213.

[189]. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae) [J]. In Vitro. 13(4): 213-217.

[190]. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi [J]. Science, 297(5588): 1833-1837.

[191]. Wang L, Hu H, Yang J, Wang F, Kaisermayer C, Zhou P. 2012. High yield of human

Monoclonal antibody produced by stably transfected Drosophila schneider 2 cells in perfusion culture using wave bioreactor [J]. Mol Biotechnol. 52(2): 170-179.

[192]. Wang Q, Yang J, Zhou G, Zhang H, Chen J, Adams MJ. 2010. The Complete Genome Sequence of Two Isolates of Southern rice black-streaked dwarf virus, a New Member of the Genus Fijivirus [J]. J Phytopathol. 158: 733-737.

[193]. Wei T, Chen H, Ichiki-Uehara T, Hibino H, Omura T. 2007. Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis [J]. J Virol. 81(14): 7811-7815.

[194]. Wei T, Kikuchi A, Moriyasu Y, Suzuki N, Shimizu T, Hagiwara K, Chen H, Takahashi M, Ichiki-Uehara T, Omura T. 2006a. The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures [J]. J Virol. 80(17): 8593-8602.

[195]. Wei T, Shimizu T, Haqiwara K, Kikuchi A, Moriyasu Y, Suzuki N, Chen H, Omura T. 2006b. Pns12 protein of Rice dwarf virus is essential for formation of viroplasms and nucleation of viral-assembly complexes [J]. J gen virol. 87(2): 429-438.

[196]. Wei T, Uehara-Ichiki T, Miyazaki N, Hibino H, Iwasaki K, Omura T. 2009. Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells [J]. J Virol. 83(20): 10830-10835.

[197]. Whitfield A E, Kumar N K, Rotenberg D, Ullman D E, Wyman E A, Zietlow C, Willis D K, German T L. 2008. A soluble form of the Tomato spotted wilt virus(TSWV) glycoprotein G(N) (G(N) -S) inhibits transmission of TSWV by Frankliniella occidentalis [J]. Phytopathology, 98(1): 45-50.

[198]. Whitfield AE, Ullman DE, German TL. 2005. Expression and characterization of a soluble form of tomato spotted wilt virus glycoprotein GN [J]. J Virol. 2004, 78(23): 13197-13206.

[199]. Whitfield AE, Ullman DE, German TL. Tomato spotted wilt virus glycoprotein G(C) iscleaved at acidic pH [J]. Virus Res. 110(1-2): 183-186.

[200]. Wu J, Du Z, Wang C, Cai L, Hu M, Lin Q, Wu Z, Li Y, Xie L. 2010a. Identification of Pns6, a putative movement protein of RRSV, as a silencing suppressor [J]. Virol J. 7: 335. doi: 10.1186/1743-422X-7-335.

[201]. Wu Z, Wu J, Adkins S, Xie L, Li W. 2010b. Rice ragged stunt virus segment S6-encoded nonstructural protein Pns6 complements cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus-based chimeric virus [J]. Virus Res. 152 (1-2): 176-179.

[202]. Xiong R, Wu J, Zhou Y, Zhou X. Identification of a move-ment protein of the tenuivirus rice stripe virus [J]. J Virol. 2008, 82(24): 12304-12311.

[203]. Xu Y, Zhou W, Zhou Y, Wu J, Zhou X. 2012. Transcriptome and comparative gene expression analysis of Sogatella furcifera (Horváth) in response to southern rice black-streaked dwarf virus [J]. PLoS One. 7(4): e36238.

[204]. Yan J, tomaru M, Takahashi A, Kimural I, Hibino H, Omura T. 1996. P2 protein encoded by genome segment S2 of rice dwarf phytoreovirus is essential for virus infection [J]. Virology, 224(2): 539-541.

[205]. Yin X, Xu FF, Zheng FQ, Li XD, Liu BS, Zhang CQ. 2011. Molecular Characterization of Segments S7 to S10 of a Southern Rice Black-streaked Dwarf Virus Isolate from Maize in Northern China [J]. Virol sin. 26(1): 47-53.

[206]. Young BA, Hein GL, French R, Stenger DC. 2007. Substitution of conserved cysteine residues in wheat streak mosaic virus HC-Pro abolishes virus transmission by the wheat curl

Mite [J]. Arch Virol. 152(11): 2107-2111.

[207]. Yuan Z, Chen H, Chen Q, Omura T, Xie L, Wu Z, Wei T. 2011. The early secretory pathway and an actin-myosin VIII motility system are required for plasmodesmatal localization of the NSvc4 protein of Rice stripe virus [J]. Virus Res. 159(1): 62-68.

[208]. Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G. 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect Nilaparvata lugens [J]. PloS ONE, 6(5): e20504.

[209]. Zhang C, Liu Y, Liu L, Lou Z, Zhang H, Miao H, Hu X, Pang Y, Qiu B. 2008. Rice black streaked dwarf virus P9-1, an a-helical protein, self-interacts and forms viroplasms in vivo [J]. J Gen Virol. 89(7): 1770-1776.

[210]. Zhang C, Pei X, Wang Z, Jia S, Guo S, Zhang Y, Li W. 2012. The rice stripe virus pc4 functions in movement and foliar necrosis expression in Nicotiana benthamiana [J]. Virology, 425(2): 113-121.

[211]. Zhang H, Chen J, Adams M. 2001. Molecular characterisation of seg-ments 1 to 6 of rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome [J]. Arch Virol. 146(12): 2331-2339.

[212]. Zhao YY, Liu F, Yang G, You MS. 2010. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management [J]. Insect Mol Biol. 20(1): 97-104.

[213]. Zhou F, Pu Y, Wei T, Liu H, Deng W, Wei C, Ding B, Omura T, Li Y. 2007. The P2 capsid protein of the nonenveloped Rice dwarf phytoreovirus induces membrane fusion in insect host cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 104(49): 19547-19552.

[214]. Zhou GY, Lu XB, Lu HJ, Lei JL, Chen SX, Gong ZX. 1999. Rice ragged stunt oryzavirus: role of the viral spike protein in transmission by the insect vector [J]. Ann Appl Biol. 135(3): 573-578.

[215]. Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SR. 2010. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata [J]. Pest Management Science, 67(2): 175-18.

致 **谢**

本论文是在导师谢联辉教授、魏太云研究员的悉心指导下完成的。四年的博士学习中，导师谢联辉教授以严谨的治学态度、缜密的科学思维和敏锐的科学洞察力，不仅教授我如何做学问，而且教我如何做人，每次与谢老师的交谈都会使我在为人处事方面有所收获，这些点点滴滴将使我在今后的人生道路上终身受益。导师魏太云研究员严肃认真的科学态度、严谨务实的治学精神、精益求精的工作作风，对科研事业的执着追求和废寝忘食的工作精神，无时无刻不深深地感染和激励着我，是我在科研道路上不断学习的榜样。谢老师和魏老师在我博士论文的选题、实验的设计、实验的实施、到论文的撰写和修改过程中花费了大量的心血和智慧，指引我逐步走上科研的道路。在此论文完成之际谨向两位恩师致以最诚挚的感谢和祝福，是你们的辛勤培养和无私传授成就了今天的我！

衷心感谢病毒所吴祖建研究员、谢荔岩老师多年来在学习、生活和找工作上给予的无私帮助。感谢课题组陈红燕老师、陈倩老师、刘启飞老师、毛倩卓老师、韦娟老师和吴维老师在学习和生活上给予的大力支持与帮助。感谢袁正杰博士，章松柏博士生、郑立敏博士生、夏晓翠博士生、兰汉红博士生，郑爱玲硕士、戴兆基硕士，马元元硕士生、郭年梅硕士生、韩庆梅硕士生、程双凤硕士生、任堂雨硕士生、张鹏硕士生、郑胜兰硕士生、杜雪硕士生、姚景海硕士生等对我实验上的帮助。感谢杜振国博士在毕业论文撰写过程中的帮助。感谢病毒所所有兄弟姐妹们，多年来大家友爱互助、同舟共济、积极进取，使我终身难忘！

深深地感谢我的父母，是你们一贯的倾力支持与无私关爱给予了我不断前行的勇气和动力。感谢我的女友孙嘉峰，在论文完成的的艰苦岁月里是你伴我一同度过，是你深深的理解和支持让我坚强地面对一切，最终完成论文和学业。

最后谨向所有关心、帮助和支持过我的老师、同学和朋友致以衷心的感谢和诚挚的祝福，好人一生平安！

贾东升

2013年5月1 日

# 个人简介

贾东升，男，汉族，1981年出生于ft西省沁源县，中共党员。

2005年6月毕业于西北农林科技大学农学专业，获农学学士学位；

2008年6月毕业于西北农林科技大学作物遗传育种专业，获农学硕士学位；

2009年9月于福建农林大学攻读植物病理学博士学位，主要从事水稻病毒与介体昆虫的互作机理研究。

博士期间发表的相关论文：

1. **Dongsheng Jia**, Hongyan Chen, Ailing Zheng, Qian Chen, Qifei Liu, Lianhui Xie, Zujian Wu\*, Taiyun Wei\*. Development of an insect vector cell culture and RNA interference system to investigate the functional role of fijivirus replication

Protein. Journal of Virology. 2012, 88(10): 5800-5807.

2. **Dongsheng Jia**, Nianmei Guo, Hongyan Chen, Fusamichi Akita, Lianhui Xie,

Toshihiro Omura\*, Taiyun Wei\*. Assembly of the viroplasm by viral

Non-structural protein Pns10 is essential for persistent infection of rice ragged stunt virus in its insect vector. Journal of General Virology. 2012, 93(10): 2299-2309.

3. **Dongsheng Jia**, Hongyan Chen, Qianzhuo Mao, Qifei Liu, Taiyun Wei\*.

Restriction of viral dissemination from the midgut determines incompetence of small brown planthopper as a vector of Southern rice black-streaked dwarf virus. Virus research. 2012, 167(2): 404-408.

4. Ying Liu, **Dongsheng Jia (共同第一作者)**, Hongyan Chen, Qian Chen, Lianhui

Xie, Zujian Wu\*, Taiyun Wei\*. The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. Arch Virology, 2011, 156(10): 1729-1736.

5. Zhenguo Du, Donglai Xiao, Jianguo Wu, **Dongsheng Jia**, Zhengjie Yuan, Ying Liu, liuyang Hu, Zhao Han, Taiyun Wei, Qiyin Lin, Zujian Wu\*, Lianhui Xie\*.

P2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. Molecular plant pathology, 2011, 12(8): 808-814.

6. Lianming Lu, Zhenguo Du, Meiling Qin, Ping Wang, Hanhong Lan, Xiaoqin Niu,

**Dongsheng Jia**, Qiying Lin, Lianhui Xie\*, Zujian Wu\*. Pc4, a putative movement protein of Rice stripe virus, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. Virus Genes. 2009, 38:320-327.

7. Yuanyuan Ma, Wei Wu, Hongyan Chen, Qifei Liu, **Dongsheng Jia**, Qianzhuo

Mao, Qian Chen, Zujian Wu, Taiyun Wei\*. An insect cell line derived from the small brown planthopper supports replication of Rice stripe virus, a tenuivirus. Journal of General Virology. 2013, 94(6):1421-1425.

8. Qianzhuo Mao, Shenglan Zhen, Qinmei Han, Hongyan Chen, Yuanyuan Ma, **Dongsheng Jia**, Qian Chen, and Taiyun Wei\*. A new model for the genesis and maturation of the viroplasms induced by plant reoviruses. Journal of Virology. 2013, 87(12), 6819-6828.

9. **贾东升**，马元元，杜雪，陈红燕，谢联辉\*，魏太云\*. 水稻黑条矮缩病毒在

灰飞虱消化系统的侵染和扩散过程. 植物病理学报，2013（已接收）

10. **贾东升**，任堂雨，陈红燕，魏太云，谢联辉\*. 白背飞虱体内RNAi技术的建立. 福建农林大学学报（自然科学版），2013（已接收）

11. 袁正杰，**贾东升**，吴祖建，魏太云\*，谢联辉\*. NSvc4和CP蛋白与水稻条纹病毒的致病相关. 中国农业科学，2013, 46(1)：46-53.

12. 肖冬来，**贾东升**，吴建国，杜振国，谢荔岩，吴祖建\*，谢联辉\*. 水稻条纹病毒NS3蛋白与水稻GAPDH间的互作. 中国水稻科学, 2010, 24(5)：493-496.