

大豆花叶病毒侵染性克隆研究进展

张恩柱¹, 赵伟², 张淋淋¹, 韩庆玥¹, 张俊华¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江出入境检验检疫局, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV) 是一种株系复杂且不断变化、并对大豆的产量和质量造成恶劣影响的病毒, 其严重的致病性受到学者的普遍关注。大豆花叶病毒侵染性克隆技术是研究其致病机理的行之有效的手段。该技术通过病毒侵染获得侵染性 cDNA 克隆, 进一步分析引起症状的相应基因在植株生长过程中的作用机制, 由此为 SMV 相关领域的研究奠定理论基础。本文就大豆花叶病毒侵染性克隆的构建策略和影响因素, 以及其应用状况作一综述, 以期为大豆花叶病毒的防治提供新的借鉴和思路。

关键词:大豆; 大豆花叶病毒; 侵染性克隆

中图分类号:S432. 4 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 05. 0808

Advances in Infectious Cloning of Soybean Mosaic Virus

ZHANG En-zhu¹, ZHAO Wei², ZHANG Lin-lin¹, HAN Qing-yue¹, ZHANG Jun-hua¹

(1. Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China)

Abstract: Soybean mosaic virus (SMV) is a complex and ever-changing virus that has a negative effect on the yield and quality of soybeans. Its serious pathogenicity is generally concerned by scholars associated with the field of soybean research. The SMV is mainly infected with soybean aphids. The research technique of soybean mosaic virus infection cloning was effective and widely adopted to study its pathogenic mechanism. This technique can further analyze the mechanism of the genes that cause the corresponding symptoms in the process of plant growth through the obtained infectious cDNA clones. At the same time, prepared monoclonal antibody can be used as the development of soybean mosaic virus detection kit probe material. As a basis for the study of SMV related fields, based on the relationship between soybean mosaic virus disease and SMV infection cloning technique. This paper briefly summarizes the construction strategy and influencing factors of SMV infectious clone, and summarizes the application of this technology in recent years, to provide new reference and thought for the control of soybean mosaic virus.

Keywords: Soybean; Soybean mosaic virus; Infectious clones

植物病毒一直是生物学历史上较为重要的模式系统之一, 对推动现代生物技术的发展起到不可或缺的作用。1915 年, Clinton 从大豆植株上发现大豆花叶病毒, Gardner 和 Kendrick 在 1921 年为其正式命名^[1]。SMV 的基因组为一条正义 RNA 单链^[2], 其导致寄主植株叶片发生病变, 影响寄主植株的光合作用, 通常造成植株矮化。SMV 完成复制、编码其本身遗传信息的途径依赖于寄主体内的生物合成系统。因此, 通过构建 SMV 基因的侵染性 cDNA 克隆研究大豆花叶病毒的基因功能、病毒与介体间的关系是一种在正链 RNA 病毒研究领域中通用的研究思路^[3]。本文在阐述大豆花叶病毒病与 SMV 侵染性克隆技术关系的基础上, 对 SMV 侵染性克隆的构建策略和影响因素作简要概括, 并对近年该技术的应用情况进行概述。

1 大豆花叶病毒的特性

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV) 病是一种对世界各国大豆产区的大豆产量和质量造成严重威胁的病害。SMV 主要通过大豆蚜感染大豆植株^[4], 被感染后的大豆植株叶片发生不同程度的病变, 光合作用效率降低, 植株无法进行正常生长发育, 常出现顶枯^[5]、矮化现象, 豆粒多呈现褐色斑纹^[6]。在 2000 年前, 即有报道大豆花叶病毒存在可以经由自然感染方式使蚕豆、豌豆患病的毒株^[7], 其感染寄主范围扩大至豆科植物^[8]。我国从事 SMV 领域研究的学者根据王修强等^[9]提出的鉴别体系对中国的 SMV 株系进行鉴定和动态变化分析^[10-13], 表明 SMV 的株系随时间的推移在不断增加和变化。

SMV 流行株系的变化增加了其防治难度, 如果

收稿日期: 2017-03-27
基金项目: 东北农业大学大学生创新基金(201610224147); 哈尔滨市应用技术与开发项目(2014AB6BN036); 中央引导地方科技发展专项(ZY16C06)。
第一作者简介: 张恩柱(1995 -), 男, 学士, 主要从事寄主与病原物互作研究。E-mail: zhang_enzhu@163. com。
通讯作者: 张俊华(1973 -), 男, 教授, 博导, 主要从事寄主与病原物互作研究。E-mail: podozjh@163. com。

在某个年份大豆花叶病毒普遍流行,则将使大豆产区的产量呈现断崖式的下跌^[6],SMV 发生相对严重的种植区域一般会存在面临大豆绝产的风险。国际上通用的防治 SMV 的措施是利用大豆花叶病毒侵染性克隆技术获得的生物材料筛选培育 SMV 抗性品种^[7]。同时,SMV 侵染性克隆为进一步研究大豆花叶病毒的基因功能、SMV 与寄主的互作机制等奠定了基础;也可以改造成为利用大豆花叶病毒表达外源蛋白的理想载体^[14]。

2 大豆花叶病毒侵染性克隆研究方法

侵染性 cDNA 克隆是指具有感染性的 cDNA,或可通过体外转录产生具有感染性的转录物^[14]。该技术实质是利用反向遗传学的原理,人为地构建具有直接侵染或经体外转录感染特性的病毒基因库。Ahlquist 等^[15]于 1984 年首次报道其成功构建雀麦花叶病毒(*Brome mosaic virus*, BMV)的全长 cDNA 侵染性克隆,病毒的全长 cDNA 侵染性克隆基本包含病毒 RNA 基因组内容^[16],自此开启了通过构建植物 RNA 病毒的 cDNA 侵染性克隆来达到在 DNA 分子水平上对植物病毒基因组进行修饰与分析的研究目的^[17]。Wang 等^[18]和 Furutani 等^[19]经过对前人研究的辩证思考,构建出含有 SMV 的 CP 基因载体,并将其转入到大豆体内,随后在其后代中获得了大豆花叶病毒具有高抗的大豆品种。

Fire 等^[20]对 RNA 干扰的解析为基因研究增加了新的有效工具^[21];诱导病毒基因沉默是分析植物基因相应功能的一个高效方法^[22],因此大豆花叶病毒致病机理的研究增添了全新的手段。研究人员利用此技术将 SMV 上的目的基因沉默,达到调节基因表达的目的;进而促进抗性品种对 SMV 表达出更高的特异性^[23]。若在构建成功的 SMV 侵染性克隆上引入一处或几处沉默突变,可便于鉴定拯救的病毒^[24]。随着该研究方法的成熟与不断实践,SMV 侵染性克隆的研究思路得以进一步完善,并推动其进一步发展。

3 大豆花叶病毒侵染性克隆构建策略与接种方法

3.1 SMV 全长 cDNA 的构建

现今研究人员一般均利用 RNA 分离试剂盒来获取大豆花叶病毒的 RNA。RNA 分离试剂盒在一定程度上提高了研究者的研究效率,其高效性显著提高了 RNA 的提取成功率;异硫氰酸胍一步法已逐渐被舍弃^[3]。根据 SMV 全基因组序列设计引物,将 SMV 全基因组切成几段彼此重叠的基因片段,在逆转录和 PCR 扩增反应后,严格进行筛选和鉴定后再进一步逐一将所选定片段连到载体上,随后根据酶

切位点拼接成全长的 cDNA。为确保扩增后片段在完成克隆后不发生错误,一定要经测序验证;允许反转录引物与进行 PCR 时的下游引物相同,若扩增结果未达预期目标,可以增加 PCR 下游引物与逆转录引物间的距离,增强特异性,达到预期目标^[25]。通过将小于 15 kb 的基因组分段克隆获得 SMV 的全长 cDNA,该方式被该领域的学者广为采用^[26]。有报道认为,可以利用病毒不完全的 cDNA 构建感染性克隆,但目前尚未有人获得成功^[27]。

3.2 SMV 侵染性转录物的获得

体外转录与体内转录是研究者获取稳定的 SMV 侵染性转录物的两条途径。

体外转录应将转录模板的序列紧密接于 T3、T7 或 SP6 等启动子^[28-29]核心序列的下游位置,防止多余的核苷酸被引入至转录物的 5'端,获得的全长 cDNA 克隆经限制性内切酶酶切线性化后,利用 T3、T7 或 SP6 RNA 聚合酶系统在体外进行转录试验,得到的具有感染活性的病毒基因组 RNA 用于下一步的接种试验^[30]。在 PCR 克隆得到 SMV 的 cDNA 时,通常采用融合 PCR 扩增的方法直接扩增启动子序列与病毒基因 5'末端^[31],将两段序列相连。体外转录时应格外注意在 SMV 基因组全序列的 3'端加入具有特异性的限制性酶切位点,并在体外转录之前将重组质粒线性化,以使其得以正确终止转录^[32],进而避免因转录物含有非病毒核苷酸序列而对 RNA 转录物存在感染性。

构建成功的表达质粒可以利用机械的方式导入寄主细胞中,表达质粒内重组后的 SMV 全基因组通过寄主细胞的转录系统进行转录和复制,产生有感染能力的转录物^[30],该方式即是体内转录。其感染性 RNAs 的体内生成机理尚不清楚,推测该 cDNA 运输到细胞核后被 DNA 依赖性 RNA 聚合酶转录成 RNA^[14]。以该种方式得到的 SMV 侵染性克隆不必通过昂贵的帽子结构类似物、体外转录系统等便可获得具有侵染性的 RNAs;并且得到的侵染性 RNA 较为稳定,不易降解,可于体内大量复制。

3.3 SMV 侵染性克隆接种方法

在进行大豆花叶病毒侵染性克隆研究中,通常使用农杆菌浸染法、基因枪法和机械接种 3 种方法将 SMV 接种到试验植株上^[33]。农杆菌浸染法是通过农杆菌侵染大豆,之后将它的 T-DNA 随机整合到大豆的基因组内,而插入到 T-DNA 内的大豆花叶病毒 cDNA 克隆也可以在植物细胞内得到表达。基因枪方法接种是通过利用物理方法来加速由核酸包被的粒子进入植物组织。氦气的高速气体冲击会将已经由核酸分子包被的钨粉或金粉颗粒射入大豆植株的组织中去。基因枪方法接种价钱昂贵,研究人员一般不使用此种方法。机械接种是核酸通

过石英砂在大豆叶片表面造成的微伤口直接进行侵染的接种方式。该种方式是大豆花叶病毒侵染性克隆接种方法中最简单易行的操作,但因其成功率问题并不能得到研究者的青睐。

4 大豆花叶病毒侵染性克隆的影响因素

在进行该项研究时,存在成功构建出的侵染性克隆无法对寄主植株进行感染的意外状况^[34]。现对其原因总结分析如下:

(1) 转录物异质性的对侵染性的影响

Ahlquist 等^[15]、Hamilton 和 Baulcombe^[35]的研究表明体外转录时获得的 RNA 转录物长度不等;在非基因组全长的 RNA 转录物构成的类群中,不具有复制能力、残缺的转录物会同正常的转录物在宿主细胞中发生竞争,因此可改变体外转录物的感染能力。

(2) 基因突变对侵染性的影响

Kuhn 等^[36]报道 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶在构建侵染性克隆过程中,核苷酸可能会发生错配而引发突变,且病毒的基因组越长,突变几率明显增高;发生的突变会致使转录本的感染效率下降,严重者丧失侵染能力。Domingo 等^[37]和 Ramirez 等^[38]对该种 RNA 聚合酶与 DNA 聚合酶的不忠实性进行研究,发现其所引发的突变不能被完全消除。这使得该问题的解决变得复杂,但之前也有报道表明将异位表达的同源或异源病毒基因沉默或抑制可以提高病毒转录物的感染性^[39-41]。

(3) 5'端和 3'端冗余序列对侵染性的影响

SMV 基因组为单链正义 RNA,其 3'端有一个 Poly(A)尾巴^[42]。SMV 的 Poly(A)尾巴具有使基因组结构保持稳定的作用,并对维持其侵染性具有一定的作用;当 Poly(A)尾巴长度低于阈值时,转录物 RNA 的稳定性与侵染性都将受到影响;其长度过短时,转录物 RNA 将丧失侵染性,故构建全长 cDNA 时要确保得到合理长度的 Poly(A)尾巴^[43]。在构建全长 SMV 的全长 cDNA 时,5'端的冗余序列可以降低转录物的感染性^[44]。

(4) 帽子结构(m7GpppG)对侵染性的影响

SMV 基因组 5'端含有帽子结构^[45],Shih 等^[46]发现合成转录本时含有该结构可确保转录物的侵染能力,并能提升转录物在宿主细胞内的稳定性;Kato 等^[47]报道的 Vector-Capping 技术可以确定构建的全长 cDNA 是否具有帽子结构,并可在连接过程在产生的 cDNA 序列上加上载体序列作为“帽子”;该技术可用于消除帽子结构缺失造成的转录物感染性降低。

5 大豆花叶病毒侵染性克隆的应用

SMV 侵染性克隆研究可以从分子水平上分析

SMV 基因在寄主植株中复制等过程的作用机理,这对明确其致病机理具有推动作用^[48];利用该技术,SMV 株系的划分可以从分子水平上得以证明,使 SMV 株系划分的依据更科学严谨^[49]。Mai 等^[50]构建了含大豆花叶病毒和菜豆黄色花叶病毒(*bean yellow mosaic virus*,BYMV) CP 基因片段的侵染性 cDNA 克隆,利用农杆菌进行遗传转化,可为育种工作者供给更多种类的优良亲本材料;为选育对 SMV 具有良好抗性的大豆品种夯实基础^[51-53];国内学者通过该技术在 SMV 致病机理和抗性材料研究、株系划分领域取得众多杰出成绩^[10, 23, 49]。王永志等^[26]和张淋淋等^[27]分别制备出 SMV CP 蛋白单克隆抗体和 Nib 蛋白单克隆抗体,在进行理论研究的基础上,也可以作为研制大豆花叶病毒检测试剂盒的探针材料。国内学者陶小荣的课题组基于实用迅速的侧流试验(LFA)完成了首例探测 SMV 的开发报告^[56];可广泛应用于实验室和大豆种植区的 SMV 的诊断与监测,提高了对大豆花叶病毒的监测效率。

6 展 望

研究者一致认为大豆花叶病毒(SMV)是一种在世界上发病范围广、发生频率高、易造成严重损失的植物病毒。当 SMV 在大豆生产区遇到复合侵染时,且没有交叉保护出现时,将会增加“共生”现象出现的可能性。这将在一定程度上促使大豆种植区域 SMV 的致病性发生变异^[57],并促进新 SMV 株系的产生。防治 SMV 的措施中,选育抗 SMV 的大豆品种是既经济又高效的防治策略,我国研究人员应充分利用 SMV 侵染性克隆技术的优势与潜力,为抗性品种选育提供充足的遗传材料和研究策略^[58],进而推进大豆花叶病毒的防治工作进入下一个新阶段。

参考文献

[1] Gardner M W, Kendrick J B. Soybean mosaic virus[J]. Journal of Agricultural Research, 1921, 2(10): 111-114.
[2] 杨永庆. 大豆花叶病毒重组型分离物的鉴定及抗大豆花叶病毒基因的定位及功能分析[D]. 南京:南京农业大学, 2012. (Yang Y Q. Identify soybean mosaic virus-recombination isolate and mapping and functional analysis of SMV resistance gene[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural College, 2012.)
[3] 吴海祥, 张楚瑜. 正链 RNA 病毒基因组感染性克隆研究进展[J]. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(4): 493-499. (Wu H X, Zhang C Y. Research advancements of genomic infectious cDNA clone of positive-strand RNA virus[J]. Journal of Wuhan University(Natural Science Edition), 2002, 48(4): 493-499.)
[4] 智海剑, 盖钧镒. 大豆花叶病毒及抗性遗传的研究进展[J]. 大豆科学, 2006, 25(2): 174-180. (Zhi H J, Gai J Y. Advances in the studies on soybean mosaic virus[J]. Soybean Sci-

- ence, 2006, 25(2): 174-180.)
- [5] 张锴, 王宇, 王涛, 等. 大豆花叶病毒引发大豆不同症状的生理特性比较[J]. 植物病理学报, 2016, 46(4): 1-8. (Zhang K, Wang Y, Wang T, et al. Comparison of physiological property on soybean leaves showing different symptoms induced by soybean mosaic virus[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(1): 1-8.)
 - [6] 李凯, 夏迎春, 王大刚, 等. 黑龙江省大豆花叶病毒(SMV)株系的动态变化分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 880-884. (Li K, Xia Y C, Wang D G, et al. Analysis of dynamic change of soybean mosaic virus strains in Heilongjiang province of China [J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 880-884.)
 - [7] 郑翠明. 大豆对 SMV3 号株系的抗性遗传及分子标记研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2000. (Zheng C M. Inheritance of resistance to SMV3 and identification of molecular markers linked to resistance gene in soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000.)
 - [8] 王大刚, 张磊, 智海剑. 大豆花叶病毒株系鉴定与分子生物学研究进展[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 668-674. (Wang D G, Zhang L, Zhi H J. Advances in identification of strains and molecular biology of soybean mosaic virus[J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 668-674.)
 - [9] 李凯. 中国南方大豆花叶病毒株系的鉴定、抗性遗传和抗性基因的定位[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. (Li K. Strain identification of soybean mosaic virus and inheritance and gene mapping of its resistance in soybeans in Southern China [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
 - [10] Li K, Yang Q H, Zhi H J, et al. Identification and distribution of soybean mosaic virus strains in Southern China [J]. Plant Disease, 2010, 94(3): 351-357.
 - [11] 王大刚, 田震, 李凯, 等. 鲁豫皖大豆产区大豆花叶病毒株系的鉴定及动态变化分析[J]. 大豆科学, 2013, 32(6): 806-809. (Wang D G, Tian Z, Li K, et al. Identification and variation analysis of soybean mosaic virus strains in Shandong, Henan and Anhui provinces of China [J]. Soybean Science, 2013, 32(6): 806-809.
 - [12] 杨永庆, 侯文焕, 边全乐, 等. 河北地区大豆花叶病毒株系的组成与分布[J]. 大豆科学, 2014, 33(1): 87-90. (Yang Y Q, Hou W H, Bian Q L, et al. Composition and distribution of SMV strains in Hebei [J]. Soybean Science, 2014, 33(1): 87-90.)
 - [13] 李凯, 夏迎春, 王大刚, 等. 黑龙江省大豆花叶病毒(SMV)株系的动态变化分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 880-884. (Li K, Xia Y C, Wang D G, et al. Analysis of dynamic change of soybean mosaic virus strains in Heilongjiang province of China [J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 880-884.)
 - [14] Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses[J]. Virology, 1994, 198(2): 415-426.
 - [15] Ahlquist P, French R, Janda M, et al. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81(22): 7066-7070.
 - [16] Nagyová A, Subr Z. Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors[J]. Acta Virologica, 2007, 51: 223-237.
 - [17] Orflio A F, Fortes I M, Navas-Castillo J. Infectious cDNA clones of the crinivirus tomato chlorosis virus are competent for systemic plant infection and white fly-transmission [J]. Virology, 2014, 464: 365-374.
 - [18] Wang X, Eggenberger A L, Nutter F W, et al. Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean[J]. Molecular Breeding, 2001, 8(2): 119-127.
 - [19] Furutani N, Hidaka S, Kosaka Y, et al. Coat protein genemediated resistance to soybean mosaic virus in transgenic soybean[J]. Breeding Science, 2006, 56(2): 119-124.
 - [20] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
 - [21] 徐俊, 毛颖, 苗荻, 等. RNA 干扰技术的研究进展[J]. 生物技术世界, 2012(3): 15-17. (Xu J, Mao Y, Miao D, et al. Advances in RNA interference technology [J]. Biotech World, 2012(3): 15-17.
 - [22] Whitham S A, Lincoln L M, Chowda-Reddy R V, et al. Virus-induced gene silencing and transient gene expression in soybean (*Glycine max*) using bean pod mottle virus infectious clones[J]. Current Protocols in Plant Biology, 2016(1): 263-283.
 - [23] 高乐, 翟锐, 丁雪妮, 等. 大豆花叶病毒 CP 基因 RNAi 载体的构建及大豆遗传转化[J]. 植物保护学报, 2014, 41(4): 453-460. (Gao L, Zhai R, Ding X N, et al. RNAi vector construction of soybean mosaic virus CP gene and soybean transformation [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2014, 41(4): 453-460.)
 - [24] 郝冀. 新型水貂阿留申病毒感染性克隆的构建及其生物学特性鉴定[D]. 北京: 中国农业大学, 2016. (Xi J. Construction of neotype aleutian mink disease virus infectious clone and identification of its biological characteristics [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.)
 - [25] Gritsunt S, Could E A. Development and analysis of a tick borne encephalitis infectious clone using a novel and rapid strategy[J]. Journal of Virological Methods, 1998, 76: 109-120.
 - [26] 黄耀伟, 李龙, 于涟. 人类及动物 RNA 病毒的反向遗传系统[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 311-318. (Huang Y W, Li L, Yu L. The reverse genetics systems for human and animal RNA viruses [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(3): 311-318.)
 - [27] 申识川, 冯力, 时洪艳, 等. 正链 RNA 病毒感染性克隆的构建策略及影响因素[J]. 东北农业大学学报, 2009, 39(8): 134-139. (Shen S C, Feng L, Shi H Y, et al. Construction strategy and influence factors of positive-strand RNA virus infectious clone [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 39(8): 134-139.)
 - [28] Melton D A, Krieg P A, Rebagliati M R, et al. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(18): 7035-7056.
 - [29] Dunn J J, Studier F W, Gottesman M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 477-535.
 - [30] Carvalho S L, Nagata T, Junqueira B R, et al. Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus[J]. Virus Genes, 2017, 53(1): 137-140.
 - [31] Weiland J J, Dreher T W. Infectious TYMV RNA from cloned cDNA: Effects *in vitro* and *in vivo* of point substitutions in the initiation codons of two extensively overlapping ORFs [J]. Nucleic

- acids research, 1989, 17(12): 4675-4687.
- [32] 司伏生. 猪戊型肝炎病毒分子流行病学分析及基因3型猪戊型肝炎病毒感染性克隆的构建[D]. 南京: 南京农业大学, 2011. (Si F S. Analysis of molecular epidemiology of swine hepatitis e virus (HEV) in Shanghai and construction of infectious cDNA clone of swine genotype 3HEV[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.)
- [33] 高瑞. 烟草脉带花叶病毒侵染性克隆的构建及其在交叉保护、外源蛋白表达及VIGS中的应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012. (Gao R. Construction of an infectious cDNA clone of Tobacco vein banding mosaic virus and its use for cross-protection, protein over-expression and VIGS[D]. Taian: Shangdong Agricultural University, 2012.)
- [34] 谈珺. 黄瓜花叶病毒M株系侵染性cDNA克隆的构建及3a基因的原核表达[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007. (Tan J. Construction of infectious cDNA clone of cucumber mosaic virus strain M and 3a gene expressed in escherichia coli[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2007.)
- [35] Hamilton W D O, Baulcombe D C. Infectious RNA produced by *in vitro* transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA[J]. Journal of General Virology, 1989, 70(4): 963-968.
- [36] Kuhn R J, Hong Z, Strauss J H. Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA[J]. Journal of Virology, 1990, 64(4): 1465-1476.
- [37] Domingo E. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses [J]. The Evolutionary Biology of Viruses, 1994: 161-184.
- [38] Ramirez B C, Garcin D, Calvert L A, et al. Capped nonviral sequences at the 5' end of the mRNAs of rice hoja blanca virus RNA4 [J]. Journal of Virology, 1995, 69(3): 1951-1954.
- [39] Chiba M, Reed J C, Prokhnevsky A I, et al. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon [J]. Virology, 2006, 74(1): 7-14.
- [40] Liu Z, Kearney C M. A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and Nicotiana [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 147(3): 151-159.
- [41] Yoon J Y, Choi S K, Palukaitis P, et al. *Agrobacterium*-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses [J]. Virus Research, 2011, 160(1): 428-434.
- [42] 孙浩华, 薛峰, 陈集双. 大豆花叶病毒研究进展[J]. 生命科学, 2007, 18(3): 338-345. (Sun H H, Xue F, Chen J S. Advances in study on soybean mosaic virus (SMV) [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2007, 18(3): 338-345.)
- [43] Jackson R J, Standart N. Do the poly (A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? [J]. Cell, 1990, 62(1): 15-24.
- [44] 云涛. DHV-I 感染性分子克隆的建立及其衍生病毒的生物学特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010. (Yun T. Development and characterizations of an infectious molecular clone and its derivatives of duck hepatitis virus type I [D]. Yangling: North West Agricultural and Forestry University, 2010.)
- [45] Kekarainen T, Savilahti H, Valkonen J P T. Functional genomics on potato virus A: Virus genome-wide map of sites essential for virus propagation [J]. Genome Research, 2002, 12(4): 584-594.
- [46] Shih D S, Dasgupta R, Kaesberg P. 7-Methyl-guanosine and efficiency of RNA translation [J]. Journal of Virology, 1976, 19(2): 637-642.
- [47] Kato S, Ohtoko K, Ohtake H, et al. Vector-Capping: A simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library [J]. DNA Research, 2005, 12(1): 53-62.
- [48] 刘宁, 刘若森, 马莹, 等. 中国大豆花叶病毒 HC-Pro 基因的克隆与序列分析 [J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 549-554. (Liu N, Liu R M, Ma Y, et al. Cloning and sequence analysis of HC-Pro gene of soybean mosaic virus [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 549-554.)
- [49] 王大刚, 智海剑, 田震, 等. 大豆花叶病毒致病基因的克隆与序列分析 [J]. 大豆科学, 2015, 34(5): 760-767. (Wang D G, Zhi H J, Tian Z, et al. Clone and sequence analysis of virulence genes of soybean mosaic virus isolates in China [J]. Soybean Science, 2015, 34(5): 760-767.)
- [50] Mai T L T, Tung P T, Son L V, et al. Construction of vector carrying RNAi structures containing CP gene fragment from SMV and BYMV [J]. Journal of Biology, 2014, 35(3se): 129-135.
- [51] 刘江, 陈沛, 邢光南, 等. 大豆查尔酮还原酶基因 *GmCHR* 的克隆与植物表达载体构建 [J]. 大豆科学, 2013, 32(2): 139-142. (Liu J, Chen P, Xing G N, et al. Cloning of the soybean chalcone reductase gene *GmCHR* and construction of its plant expression vector [J]. Soybean Science, 2013, 32(2): 139-142.)
- [52] 王彬, 徐志华, 侯金锋, 等. 大豆细胞质转化酶基因 *GmClnv* 的克隆与植物表达载体构建 [J]. 大豆科学, 2014, 33(2): 168-172. (Wang B, Xu Z H, Hou J F, et al. Cloning of soybean cytoplasmic invertase gene *GmClnv* and construction of its plant expression vector [J]. Soybean Science, 2014, 33(2): 168-172.)
- [53] Liu C, Yang B, Ming Y, et al. Construction of an RNAi vector for knockdown of *GM-ACS* genes in the cotyledonary nodes of soybean [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 26: 40-45.
- [54] 王永志, 苏颖, 米丽娟, 等. 东北地区大豆花叶病毒3号株系衣壳蛋白的表达、纯化及单克隆抗体制备 [J]. 吉林农业科学, 2011, 36(6): 37-39. (Wang Y Z, Su Y, Mi L J, et al. Expression, purification and monoclonal antibody preparation of northeastern region SMV CP protein [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2011, 36(6): 37-39.)
- [55] 张淋淋, 李小叶, 张春雨, 等. 大豆花叶病毒东北3号株系 Nlb 蛋白表达、纯化及单克隆抗体制备 [J]. 东北农业科学, 2016, 41(3): 62-66. (Zhang L L, Li X Y, Zhang C Y, et al. Expression and purification of a Nlb protein of the SMV strain 3 from the northeastern regions of China and preparation of its monoclonal antibody [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2016, 41(3): 62-66.)
- [56] Zhu M, Zhang W, Tian J, et al. Development of a lateral-flow assay (LFA) for rapid detection of soybean mosaic virus [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 235: 51-57.
- [57] 王大刚, 田震, 李凯, 等. 鲁豫皖大豆产区大豆花叶病毒株系的鉴定及动态变化分析 [J]. 大豆科学, 2013, 32(6): 806-809. (Wang D G, Tian Z, Li K, et al. Identification and variation analysis of soybean mosaic virus strains in Shandong, Henan and Anhui provinces of China [J]. Soybean Science, 2013, 32(6): 806-809.)
- [58] 章洁琼, 李红艳, 胡小南, 等. 农杆菌介导的 RNAi CP 基因在大豆中的转化 [J]. 作物学报, 2013, 39(9): 1594-1601. (Zhang J Q, Li H Y, Hu X N, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of RNAi CP gene into soybean (*Glycine max* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(9): 1594-1601.)