



# 水稻 OsAGO 家族成员特征及对 RGDV 和 SRBSDV 的响应

魏莹<sup>1</sup> 林冬煊<sup>1</sup> 刘鸿飞<sup>1</sup> 徐荣荣<sup>1</sup> 朱永生<sup>2</sup> 吴建国<sup>1\*</sup> 赵珊珊<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学虫媒介病毒研究中心, 福建省植物病毒学重点实验室, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350002)

**摘要:** 为初步探究 OsAGO 家族在水稻抗病毒通路中的功能, 对水稻 OsAGO 蛋白的基因组结构、系统发育关系、氨基酸序列及水稻瘤矮病毒 (rice gall dwarf virus, RGDV) 和南方水稻黑条矮缩病毒 (southern rice black streaked dwarf virus, SRBSDV) 侵染后的转录组数据进行分析, 同时采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 技术对这 2 种病毒侵染后 OsAGO 基因的相对表达量变化进行验证。结果表明, 19 个水稻 OsAGO 蛋白的外显子数量、内含子数量及编码区长度存在较大差异, 且这 19 个 OsAGO 蛋白均匀分布在 3 个分支中; OsAGO 蛋白 PAZ 结构域中与小 RNA 结合相关的 YF (酪氨酸-苯丙氨酸) 基序在 OsAGO2、OsAGO3 和 OsAGO5 中变成了 YY (酪氨酸-酪氨酸), OsAGO 蛋白 PIWI 结构域中与 OsAGO 蛋白切割活性相关的 DDX (X 代表 H 或 D, 即天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸/天冬氨酸) 基序在 OsAGO13 中替换为 LDH (亮氨酸-天冬氨酸-组氨酸) 基序, 而在 OsAGO17 中不包含 YF 基序且 DDX 基序替换为 HDR (组氨酸-天冬氨酸-精氨酸) 基序。RGDV 侵染后 *OsAGO5* 和 *OsAGO12* 基因的转录组分析结果与 qPCR 结果一致, 其中 *OsAGO5* 上调表达, *OsAGO12* 下调表达; SRBSDV 侵染后 *OsAGO1a*、*OsAGO1b*、*OsAGO1c*、*OsAGO1d* 和 *OsAGO4b* 基因的转录组分析结果与 qPCR 结果一致, 均上调表达。表明大多数 OsAGO 均能响应 RGDV 和 SRBSDV 的侵染。

**关键词:** 水稻; RNA 沉默; AGO 蛋白; 水稻瘤矮病毒; 南方水稻黑条矮缩病毒

## Characteristics of argonaute protein family members and their responses to rice gall dwarf virus and southern rice black-streaked dwarf virus infections in rice

Wei Ying<sup>1</sup> Lin Dongxuan<sup>1</sup> Liu Hongfei<sup>1</sup> Xu Rongrong<sup>1</sup> Zhu Yongsheng<sup>2</sup>  
Wu Jianguo<sup>1\*</sup> Zhao Shanshan<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Key Laboratory of Plant Virology of Fujian Province, Vector-borne Virus Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; 2. Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

**Abstract:** To explore the function of the rice argonaute protein (AGO) family in the rice antiviral pathway, we analyzed the genomic structure, phylogenetic relationships, amino acid sequences of OsAGO proteins, as well as transcriptome data after infection with rice gall dwarf virus (RGDV) and southern rice black streaked dwarf virus (SRBSDV). Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to verify the changes in relative expression levels after infection with RGDV and SRBSDV. The results showed that there were significant differences in the number of exons, introns, and coding regions among the 19

基金项目: 国家自然科学基金 (32025031, U1905203), 国家重点研发计划 (2021YFD1400500)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: sszhao88@163.com, wujianguo81@126.com

收稿日期: 2023-08-26

OsAGO transcripts, and these protein-coding sequences were evenly distributed among three branches. The tyrosine-phenylalanine (YF) motif related to small RNA binding in the PAZ domain of OsAGO proteins was changed to tyrosine-tyrosine (YY) motif in OsAGO2, OsAGO3, and OsAGO5. The aspartic acid-aspartic acid-histidine/aspartic acid (DDX) motif related to the cleavage activity of OsAGO proteins in the PIWI domain was replaced with LDH (leucine-aspartic acid-histidine) motif in OsAGO13, while in OsAGO17 which did not contain YF motif and the DDX motif was replaced with histidine-aspartic acid-arginine (HDR) motif. The transcriptome analysis results of *OsAGO5* and *OsAGO12* genes after RGDV infection were consistent with the qPCR results, with upregulated expression of *OsAGO5* and downregulated expression of *OsAGO12*. After SRBSDV infection, the transcriptome analysis results of *OsAGO1a*, *OsAGO1b*, *OsAGO1c*, *OsAGO1d*, and *OsAGO4b* genes were consistent with those of qPCR results, all showing upregulated expression. These results indicate that most OsAGO genes can respond to the infection of RGDV and SRBSDV.

**Key words:** rice; RNA silencing; AGO protein; rice gall dwarf virus; southern rice black streaked dwarf virus

水稻 *Oryza sativa* 是我国主要的粮食作物之一(王爱军等, 2023), 在生长发育过程中会受到各种生物胁迫和非生物胁迫, 其中水稻病毒病频繁发生, 以介体昆虫为传播媒介, 具有迁飞性、暴发性、间歇性、危害严重和防治困难的特点, 严重影响水稻的产量和品质, 是水稻上的重要病害(庄新建等, 2020; 张合红等, 2022)。水稻瘤矮病毒(rice gall dwarf virus, RGDV)于1981—1982年在我国广东省广泛流行, 属于呼肠孤病毒科 *Reoviridae* 植物呼肠孤病毒属 *Phytoreovirus* 成员, 在我国介体昆虫以电光叶蝉 *Maistas dorsalis* 为主(毛倩卓, 2017), 其典型发病症状为水稻植株严重矮缩, 短小而硬直, 叶色浓绿, 叶背和叶鞘上产生大小不一的瘤状突起(范怀忠等, 1983)。南方水稻黑条矮缩病毒(southern rice black streaked dwarf virus, SRBSDV)首次发现于我国广东省, 是呼肠孤病毒科斐济病毒属 *Fijivirus* 成员, 通过白背飞虱 *Sogatella furcifera* 进行传播。SRBSDV 侵染后水稻植株矮化、叶色浓绿并伴有叶尖卷曲症状(李战彪, 2019)。2017年SRBSDV在广西壮族自治区(简称广西)发生, 发病率较高, 严重地块甚至绝收, 造成严重的经济损失(王丽等, 2018)。

我国对于植物病毒的研究已有50余年, 关于植物病毒与寄主互作的研究也越来越多, 其中AGO蛋白参与植物与病毒的互作(陈晓英和方荣祥, 2014)。作为RNA沉默通路中的核心蛋白, AGO蛋白比较保守, 共编码4个结构域, 即N末端结构域、PAZ (PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE) 结构域、MID结构域和PIWI结构域, 其中N末端结构域有助于小RNA双链的解开(Kwak & Tomari, 2012), 并对

AGO蛋白行使切割功能(Hur et al., 2013); PAZ结构域能识别并结合小RNA (small RNA, sRNA) 3'末端(Song & Joshua-Tor, 2006), PAZ结构域中的酪氨酸-苯丙氨酸 (tyrosine-phenylalanine, YF) 位点是sRNA结合所必需的位点(Wu et al., 2015); MID结构域能识别并结合sRNA的5'末端; PIWI结构域包含较为保守的三元天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸/天冬氨酸 (aspartic acid-aspartic acid-histidine/aspartic acid, DDX) 催化活性中心, 这对于PIWI结构域的切割活性至关重要(Tolia & Joshua-Tor, 2007; Wu et al., 2015)。以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 为例, 开花植物的AGO蛋白可聚为3个主要分支, 分支I包括AGO1、AGO5和AGO10, 分支II包括AGO2、AGO3和AGO7, 分支III包括AGO4、AGO6、AGO8和AGO9, 它们分别在植物抗病毒防御中发挥着重要作用, 如拟南芥中AGO1和AGO2是主要抗RNA病毒的AGO蛋白(Morel et al., 2002; Harvey et al., 2011; Carbonell & Carrington, 2015); AGO3与AGO4的功能相似, 均能结合24 nt的sRNA, 并在表观遗传途径中发挥作用(Zhang et al., 2016), 且不同AGO蛋白在不同植物组织中发挥着不同的抗病毒功能(Garcia-Ruiz et al., 2015)。水稻中有19个AGO蛋白(Zhang et al., 2015), 它们在水稻抗病毒防御中也发挥着重要作用, 如OsAGO18能被水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)诱导表达(Yang et al., 2020), 进而行使抗病毒功能(Wu et al., 2017); Wang et al. (2021)最新研究发现OsAGO2通过表观遗传调控抑制 *OsHXX1* 的表达, 进而抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累, 降低水稻对SRBSDV和

水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV)的抗性,关于水稻OsAGO蛋白抗病毒功能再无其他报道。

鉴于目前关于水稻OsAGO蛋白抗病毒的研究较少,本研究对水稻19个OsAGO蛋白的结构及氨基酸特点进行分析总结,并且在解析RGDV和SRBSDV侵染后表达谱数据的基础上分别对野生型水稻中花11(Zhonghua 11, ZH11)接种这2种水稻病毒,验证RGDV和SRBSDV侵染后不同OsAGO基因的表达情况,以期探究OsAGO在水稻与病毒互作中的功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植物和昆虫:水稻品种为ZH11,由本实验室保存,将种子播于外口径10 cm、高8.3 cm的育苗盆中,每盆4粒,置于温度28~30℃、相对湿度为60%、光周期14 L:10 D的温室中生长,待苗龄为14 d时供试。养虫苗为水稻品种TN1,由本实验室保存。从自然发病的田间地块获取与RGDV和SRBSDV侵染后表型类似的水稻植株,经实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测后的毒株作为毒源,由本实验室保存。电光叶蝉和白背飞虱成虫均于水稻田采集,于温度26~29℃、相对湿度50%~60%、光周期12 L:12 D的养虫室中用TN1养虫苗进行饲养,取2龄幼虫供试。

试剂和仪器:AG RNAex Pro Reagent AG21102 RNA提取试剂Trizol,湖南艾科瑞生物工程有限公司;All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix逆转录试剂盒,兰博利德(福州)生物技术有限公司;2×RealStar Green Fast Mixture和2×Taq PCR StarMix with Loading Dye,北京康润诚业生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。Tetrad2 Peltier Thermal Cycler基因扩增仪、GelDoc XR+荧光定量PCR仪以及凝胶成像系统,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;JX820D-1便携式吸虫器,上海斯曼峰医疗器械公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 水稻OsAGO基因的结构分析

从水稻基因组注释网站(<http://rice.uga.edu/>)下载水稻OsAGO的基因结构,并对基因编码区全长及内含子和外显子的数量进行统计。

#### 1.2.2 水稻OsAGO蛋白的系统进化关系分析

采用MEGA 7.0软件的ClustalW程序对拟南芥

和水稻AGO蛋白序列进行多重比对,并利用邻接法构建系统进化树,重复检验1 000次。

#### 1.2.3 水稻OsAGO蛋白的氨基酸序列分析

分别利用蛋白结构域数据库SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和蛋白数据库UniProt(<https://www.uniprot.org/>)对OsAGO结构域进行预测,并下载各个结构域的氨基酸序列,利用GeneDoc 2.7软件对拟南芥和水稻中所有AGO蛋白的PAZ结构域和PIWI结构域的氨基酸序列进行比对。

#### 1.2.4 2种病毒侵染后OsAGO的转录组分析

从NCBI网站的GEO数据库下载RGDV侵染前后(将带毒电光叶蝉接种到2叶期的日本晴水稻幼苗上,接种1 d后将毒虫去除,接种28 d后收集水稻叶片)水稻的转录组数据,编号为GSE34264,芯片平台编号为GPL7252;SRBSDV侵染前后(将带毒白背飞虱接种到生长14 d的日本晴水稻幼苗上,接种3 d后将毒虫去除,接种28 d后收集水稻地上部组织)水稻的转录组数据来自于本实验室。首先对得到的转录组数据进行 $\log_2x$ 归一化处理,用分位数方法进行标准化,使用R包limma进行差异表达分析并绘制热图。

#### 1.2.5 2种病毒侵染后OsAGO的qPCR检测

将电光叶蝉2龄幼虫置于RGDV毒源上获毒3 d,将白背飞虱2龄幼虫置于SRBSDV毒源上获毒3 d,将幼虫置于养虫苗上循环7 d,此时传毒介体已带毒,将24头毒虫置于8株ZH11水稻幼苗上进行病毒接种,为期3 d,接种期间每天早晚将虫体从苗上拍落使其重新分布,以保证病毒接种效率,以接种无毒虫的ZH11水稻幼苗为对照(Mock),虫苗比及处理原则同上。接种4周后,收集每株ZH11水稻苗新叶的下一片叶片,用75%乙醇擦拭消毒后立即于液氮中速冻,1株苗即1个重复,每个处理8个生物学重复。

利用Trizol方法提取叶片样品的总RNA,按照All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix逆转录试剂盒说明书合成cDNA。利用Beacon Designer 7.0软件设计病毒特异性引物RGDV-S9和SRBSDV-S8(表1),并委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以合成的cDNA为模板,利用设计的引物进行PCR检测。10 μL PCR反应体系:cDNA模板1 μL、2×Taq PCR StarMix with Loading Dye 5 μL、10 μmol/L RGDV-S9/SRBSDV-S8各0.15 μL、ddH<sub>2</sub>O 3.7 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸20 s,30个循环;72℃终延

伸5 min, 12 °C 孵育2 min。反应结束后,用1.5%凝胶进行电泳成像,分析水稻是否带毒,若用RGDV-S9或SRBSDV-S8病毒特异性引物能够扩增出条带则表示水稻病毒接种成功。

利用Beacon Designer 7.0软件设计各OsAGO基因的引物(表1),并委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将合成的cDNA稀释5倍,以此为模板、以*EF1α*为内参基因,利用设计的引物进行qPCR检测。10 μL反应体系:cDNA模板1 μL、2×

RealStar Green Fast Mixture 5 μL、10 μmol/L正反向引物各0.15 μL、ddH<sub>2</sub>O 3.7 μL。反应程序:95 °C预变性1 min;95 °C变性20 s,62 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,共40个循环;进行熔解曲线分析,即65 °C梯度升温至95 °C,每0.5 °C读板1次。根据所获得的循环阈值(cycle threshold, Ct),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各处理的病毒基因片段的相对表达量。每个处理8个生物学重复,每个生物学重复设置3个技术重复。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>EF1α</i>	ACATTGCCGTCAAGTTTGCTG	AACAGCCACCGTTTGCTC
RGDV-S9	CGATAAGTATATTGGAAGAGGAT	ACTGCTAATGTGGTCAAC
SRBSDV-S8	GAGCTTCAGTGAATTGGAAAC	AGAGCCACACAATTATTTAAAATATGT
<i>OsAGO1a</i> -qPCR	TTGGTCTCGCAATGCTGTCT	TCGTTGGCCTATCACTCACA
<i>OsAGO1b</i> -qPCR	GTCCAGAAGCGGCATCACAC	TAATGAGCAGGACGGCTTGTC
<i>OsAGO1c</i> -qPCR	TAGCCATGCTGGCATTAAAGG	GAAGGCAGCCAGATGAGCATAA
<i>OsAGO1d</i> -qPCR	CGCCACCACACGAGATTATT	GCTCGTCCAGAAGGCTGTAG
<i>OsAGO2</i> -qPCR	ACCAGCAGCAGACCAAGAAC	GACTGCTCCAGAAGGCTGTAG
<i>OsAGO3</i> -qPCR	CTAACCGGGGAAGAGACGGGCA	GACCACCAGCACCAGCAGTAGTCC
<i>OsAGO4a</i> -qPCR	CGTTGCACCCATTTGCTACGC	AGGTATGGCCACCATGGCTC
<i>OsAGO4b</i> -qPCR	GTGGGCACATTCCTCAAGTT	GTATGACCTCCTTGGCTGGA
<i>OsAGO5</i> -qPCR	GAACCACTTCCTCGTCAATGT	GTCTTCCCGTGCAACTTGAT
<i>OsAGO7</i> -qPCR	GTTATGTGGTGAGGACTTG	TGGAGGTAATCTTGTGGAA
<i>OsAGO10</i> -qPCR	GCCTGTAAGATTGTTGAG	ACTGTCTGTAGAATATCCAT
<i>OsAGO12</i> -qPCR	ATCACTCCAGAATCAACTTATC	CTTCCATCATAGACAGGTAAC
<i>OsAGO13</i> -qPCR	CATAGACAGGAGATAATAGAAGA	GGAATGCGATAAGGAACT
<i>OsAGO17</i> -qPCR	TACTTGTGTAGCCACCGCAG	CACAGGCCACAACCTGATA
<i>OsAGO18</i> -qPCR	TGTTTCGTCCAGGCACAGTAG	GCGGTGAAGTTGTTGTCGTC

### 1.3 数据分析

采用GraphPad Prism 8.0软件对试验数据进行统计分析,应用独立样本*t*检验法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻OsAGO的基因组结构

19个水稻OsAGO的外显子数量、内含子数量及编码区长度差异较大,多数OsAGO基因包含21~23个外显子,但OsAGO16只有11个外显子,而OsAGO2、OsAGO3和OsAGO7仅有3个外显子。拥有最短编码区的AGO蛋白为OsAGO16,编码区长度为1 092 bp,拥有最长编码区的AGO蛋白为OsAGO15,编码区长度为6 711 bp(表2)。

### 2.2 水稻OsAGO蛋白的系统进化关系

OsAGO1a、OsAGO1b、OsAGO1c、OsAGO1d、OsAGO5、OsAGO10~OsAGO14和OsAGO17~OsAGO18聚为分支I;OsAGO2、OsAGO3和OsAGO7聚为分支II;OsAGO4a、OsAGO4b、OsAGO15和OsAGO16均为分支III(图1)。

### 2.3 水稻OsAGO家族蛋白的氨基酸序列分析

多数水稻OsAGO蛋白的PAZ结构域中含有与sRNA结合相关的YF(酪氨酸-苯丙氨酸)基序,但在OsAGO2、OsAGO3和OsAGO15中替换成了YY(酪氨酸-酪氨酸)基序,而OsAGO17中不包含YF基序;多数水稻OsAGO蛋白的PIWI结构域中含有与AGO蛋白行使切割功能的DDX(X为D/H)基序,但在OsAGO13中替换成了LDH(亮氨酸-天冬氨

酸-组氨酸)基序,而在 OsAGO17 中替换成了 HDR (组氨酸-天冬氨酸-精氨酸)基序(图2)。

#### 2.4 RGDV和SRBSDV检测

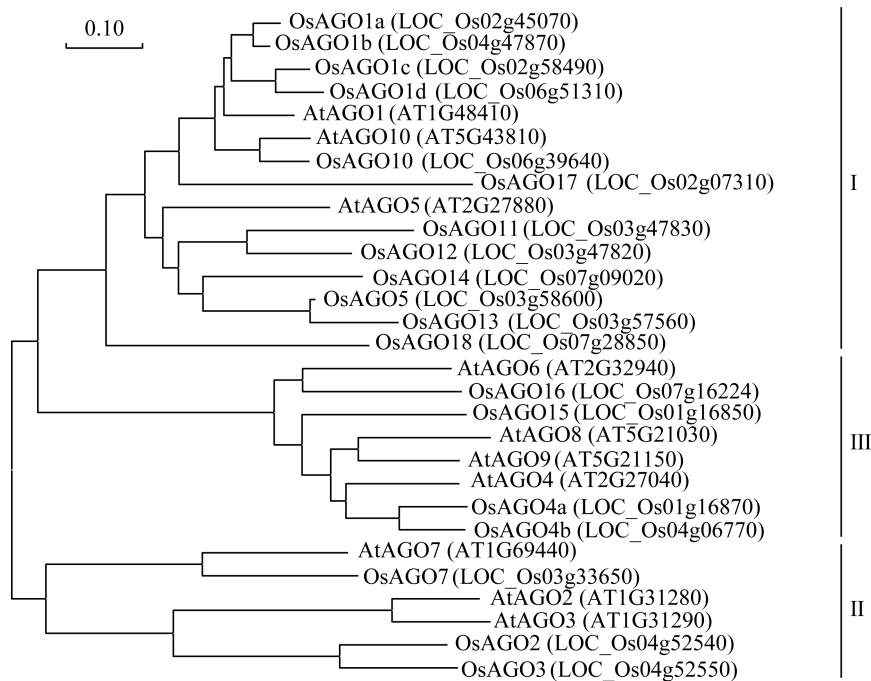
接种 RGDV 的 8 株水稻植株中均能检测到 RGDV 的 S9 片段,而对应的 Mock 水稻植株中并未检

测到 RGDV 的 S9 片段(图 3-A);同样,接种 SRBSDV 的 8 株水稻植株中均能检测到 SRBSDV 的 S8 片段,而对应的 Mock 水稻植株中并未检测到 SRBSDV 的 S8 片段(图 3-B),表明所用试验材料均带毒。

表2 水稻 OsAGO 家族基因的结构

Table 2 Structure of genes of OsAGO family in rice

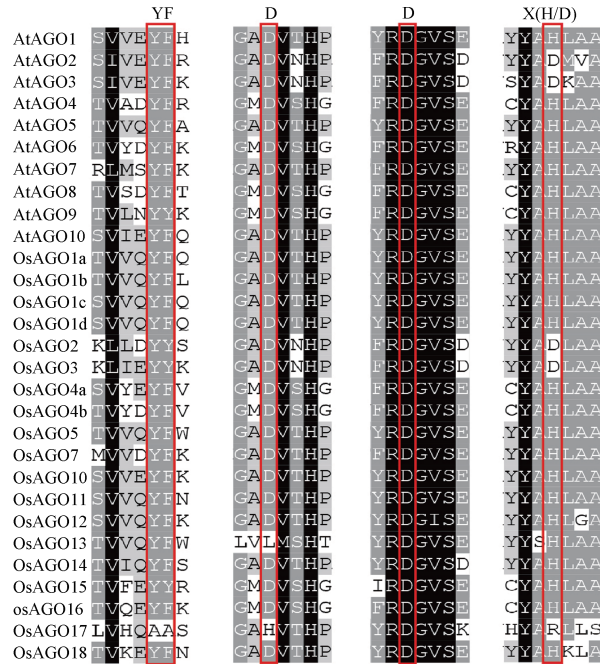
基因名称 Gene name	基因座 Locus	编码区长度 Coding sequence length/bp	内含子数量 No. of introns	外显子水量 No. of exons
<i>OsAGO1a</i>	LOC_Os02g45070	3 429	22	23
<i>OsAGO1b</i>	LOC_Os04g47870	3 357	22	23
<i>OsAGO1c</i>	LOC_Os02g58490	3 036	22	23
<i>OsAGO1d</i>	LOC_Os06g51310	3 117	22	23
<i>OsAGO2</i>	LOC_Os04g52540	3 105	2	3
<i>OsAGO3</i>	LOC_Os04g52550	3 330	2	3
<i>OsAGO4a</i>	LOC_Os01g16870	2 715	21	22
<i>OsAGO4b</i>	LOC_Os04g06770	2 736	21	22
<i>OsAGO5</i>	LOC_Os03g58600	3 177	21	22
<i>OsAGO7</i>	LOC_Os03g33650	3 147	2	3
<i>OsAGO10</i>	LOC_Os06g39640	2 922	21	22
<i>OsAGO11</i>	LOC_Os03g47830	2 679	20	21
<i>OsAGO12</i>	LOC_Os03g47820	3 177	21	22
<i>OsAGO13</i>	LOC_Os03g57560	3 183	21	22
<i>OsAGO14</i>	LOC_Os07g09020	3 159	21	22
<i>OsAGO15</i>	LOC_Os01g16850	6 711	21	22
<i>OsAGO16</i>	LOC_Os07g16224	1 092	10	11
<i>OsAGO17</i>	LOC_Os02g07310	2 631	21	22
<i>OsAGO18</i>	LOC_Os07g28850	3 267	20	21



AtAGO 和 OsAGO: 拟南芥和水稻 AGO 蛋白。AtAGO and OsAGO: AGO proteins of *A. thaliana* and *O. sativa*, respectively.

图1 采用邻接法构建拟南芥和水稻 AGO 蛋白序列的系统树

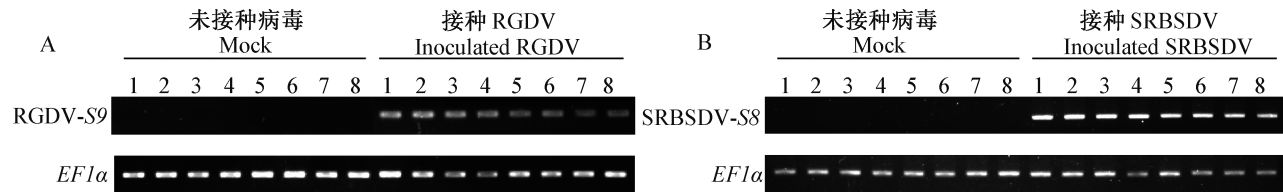
Fig. 1 Phylogenetic tree of AGO protein sequences in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* used by neighbor-joining method



红框：YF 或 DDX 基序的位置；背景表示氨基酸序列的相似性，颜色越浅则氨基酸序列相似度越低。  
 Red boxes: Locations of YF and DDX motifs; background indicates the similarity of amino acid sequences, and the lighter the background color is, the lower similarity of amino acid sequence.

图2 水稻OsAGO家族蛋白的氨基酸序列分析

Fig. 2 Amino acid sequence analysis of OsAGO family proteins in rice



1~8: 8株水稻植株。1-8: Eight rice plants.

图3 RGDV(A)和SRBSDV(B)的发病检测

Fig. 3 Detection of RGDV (A) and SRBSDV (B)

2.5 2种病毒侵染后OsAGO的转录组分析结果

OsAGO表达谱分析结果显示, RGDV侵染后, 水稻中 *OsAGO5* 和 *OsAGO7* 基因的表达显著上调, *OsAGO12* 基因的表达显著下调, 其他 OsAGO 基因的表达无显著变化(图4-A)。SRBSDV侵染后, 水稻中 *OsAGO1a*、*OsAGO1b*、*OsAGO1c*、*OsAGO1d*、*OsAGO4a* 和 *OsAGO4b* 基因的表达显著上调, *OsAGO5* 基因的表达显著下调, 其他 OsAGO 基因的表达水平无显著变化(图4-B)。

2.6 2种病毒侵染后OsAGO的qPCR分析结果

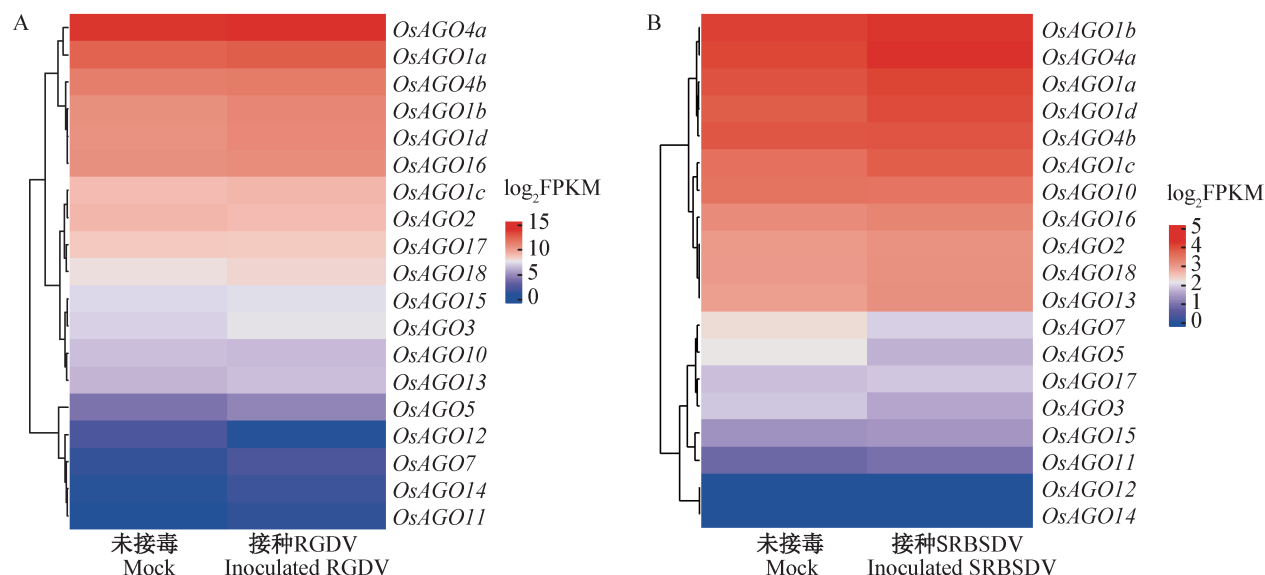
qPCR检测结果显示, RGDV侵染后 *OsAGO1c*、*OsAGO1d* 和 *OsAGO5* 基因的相对表达量极显著上调 ( $P<0.01$ ), *OsAGO1a*、*OsAGO10*、*OsAGO12*、*OsAGO13*、*OsAGO17* 和 *OsAGO18* 基因的相对表达量极显著下调 ( $P<0.01$ , 图5-A), 其中 *OsAGO5* 和

*OsAGO12* 基因的表达趋势与转录组分析结果一致; SRBSDV侵染后 *OsAGO1a*、*OsAGO1b*、*OsAGO1c*、*OsAGO1d*、*OsAGO4b*、*OsAGO7* 和 *OsAGO18* 基因的相对表达量显著上调 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), *OsAGO10*、*OsAGO12*、*OsAGO13* 和 *OsAGO17* 基因的相对表达量显著下调 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ , 图5-B), 其中 *OsAGO1a*、*OsAGO1b*、*OsAGO1c*、*OsAGO1d* 和 *OsAGO4b* 基因的表达趋势与转录组分析结果一致。

OsAGO家族大多数基因都会响应 RGDV 和 SRBSDV 这2种病毒的侵染, 其中水稻中 *OsAGO10*、*OsAGO12*、*OsAGO13* 和 *OsAGO17* 基因的相对表达量均显著下调 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 而 *OsAGO1c* 和 *OsAGO1d* 基因的相对表达量均显著上调 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), *OsAGO1a* 和 *OsAGO18* 对这2种病毒的响应呈现出完全相反的趋势; *OsAGO1b*、

*OsAGO4b* 和 *OsAGO7* 基因只对 SRBSDV 侵染有响应; *OsAGO5* 基因只对 RGDV 侵染有响应; *OsAGO2*、

*OsAGO3* 和 *OsAGO4a* 基因的相对表达量无显著变化(图5)。



FPKM: 每千个碱基的转录每百万映射读取的片段。FPKM: Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments.

图4 RGDV(A)和SRBSDV(B)侵染后水稻中OsAGO的表达谱

Fig. 4 Expression profiles of OsAGOs in rice after RGDV (A) and SRBSDV (B) infection

### 3 讨论

AGO蛋白均分布在3个主要聚类分支中,暗示了水稻AGO蛋白的进化保守。本研究通过氨基酸分析发现,PAZ结构域中的保守氨基酸YF基序在水稻*OsAGO2*、*OsAGO3*和*OsAGO15*中均替换成了YY基序,而*OsAGO17*中不包含YF基序;PIWI结构域中的保守氨基酸DDX(D/H)基序在水稻*OsAGO13*中替换成了LDH基序,而在*OsAGO17*中替换成了HDR基序,这暗示了水稻AGO蛋白功能的多样性。*OsAGO18*中YF突变为AA后,水稻更易感RSV,而将DDH突变为ADH并不影响水稻对RSV的抗性,说明sRNA结合活性对于*OsAGO18*发挥抗病毒功能十分重要(Wu et al., 2015)。*OsAGO2*、*OsAGO3*、*OsAGO13*、*OsAGO15*和*OsAGO17*是否还具有广谱抗病毒功能,值得深入研究。

AGO蛋白作为RNA沉默通路中的核心蛋白通过与sRNA直接结合调控下游基因的表达进而发挥下游功能。*AGO18*通过与*AGO1*竞争性结合miR168和miR528,分别释放其靶基因*AGO1*和抗坏血酸氧化酶基因(L-ascorbate oxidase, AO),*AGO1*通过结合病毒来源的小干扰RNA(virus-derived small interference RNA, vsiRNA)行使抗病毒功能,而AO通过促进水稻体内ROS的积累增强

水稻对病毒的抗性(Wu et al., 2015; 2017)。*OsAGO2*通过与24 nt的miR1875结合靶向*OsHXK1*的启动子,导致DNA甲基化和转录抑制的发生,进而导致葡萄糖诱导的防御相关基因下调表达以及ROS下降,最终降低水稻对稻瘟病的抗性(Sheng et al., 2023)。在水稻减数分裂前和减数分裂期间*AGO1d*在花药壁细胞中特异表达,与miR2118和miR2275结合介导相位siRNA(phased small interfering RNA, phasiRNA)的生物发生(Shi et al., 2022);*OsAGO17*与OsmiR397b形成RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complexes, RISC),其通过抑制虫漆酶的表达影响水稻籽粒大小和质量(Zhong et al., 2020)。在*OsAGO*家族的19个AGO蛋白中,不包含YF基序、DDX基序或者这些保守氨基酸发生替换的AGO蛋白是否仍可以结合sRNA并对下游靶基因进行调控进而影响水稻表型或水稻对病毒病的抗性还需要进一步的试验证明。

本研究通过转录组数据分析发现,RGDV侵染后水稻中*OsAGO5*的表达显著上调,*OsAGO12*的表达显著下调,SRBSDV侵染后只有*OsAGO1a*、*OsAGO1b*、*OsAGO1c*、*OsAGO1d*和*OsAGO4b*的表达显著上调,与qPCR检测结果一致,但*OsAGO10*、*OsAGO13*和*OsAGO17*等部分基因在2种分析结果中的表达趋势不同,究其原因可能是qPCR分析的

水稻材料与转录组数据分析的水稻材料不是同一批,取样时间、取样部位、生长趋势和生长环境等均有差异,这也说明病毒侵染后水稻中OsAGO的表达是一个动态的过程。由于*OsAGO11*、*OsAGO14*、*OsAGO15*和*OsAGO16*基因的表达量低或只在水稻某种器官中特异性表达,因此本研究中未得到有效数据。本研究通过qPCR检测发现大多数OsAGO均能响应RGDV和SRBSDV的侵染,其中*OsAGO18*

在SRBSDV侵染后显著上调,与RSV诱导后*OsAGO18*上调的表达趋势一致(Wu et al., 2015),推测*OsAGO18*对SRBSDV也存在一定的抗性;此外,*OsAGO1b*、*OsAGO4b*和*OsAGO7*只对SRBSDV侵染有响应,*OsAGO5*只对RGDV的侵染有响应,暗示着这些OsAGO可能参与水稻与SRBSDV或RGDV的互作,值得进一步研究。

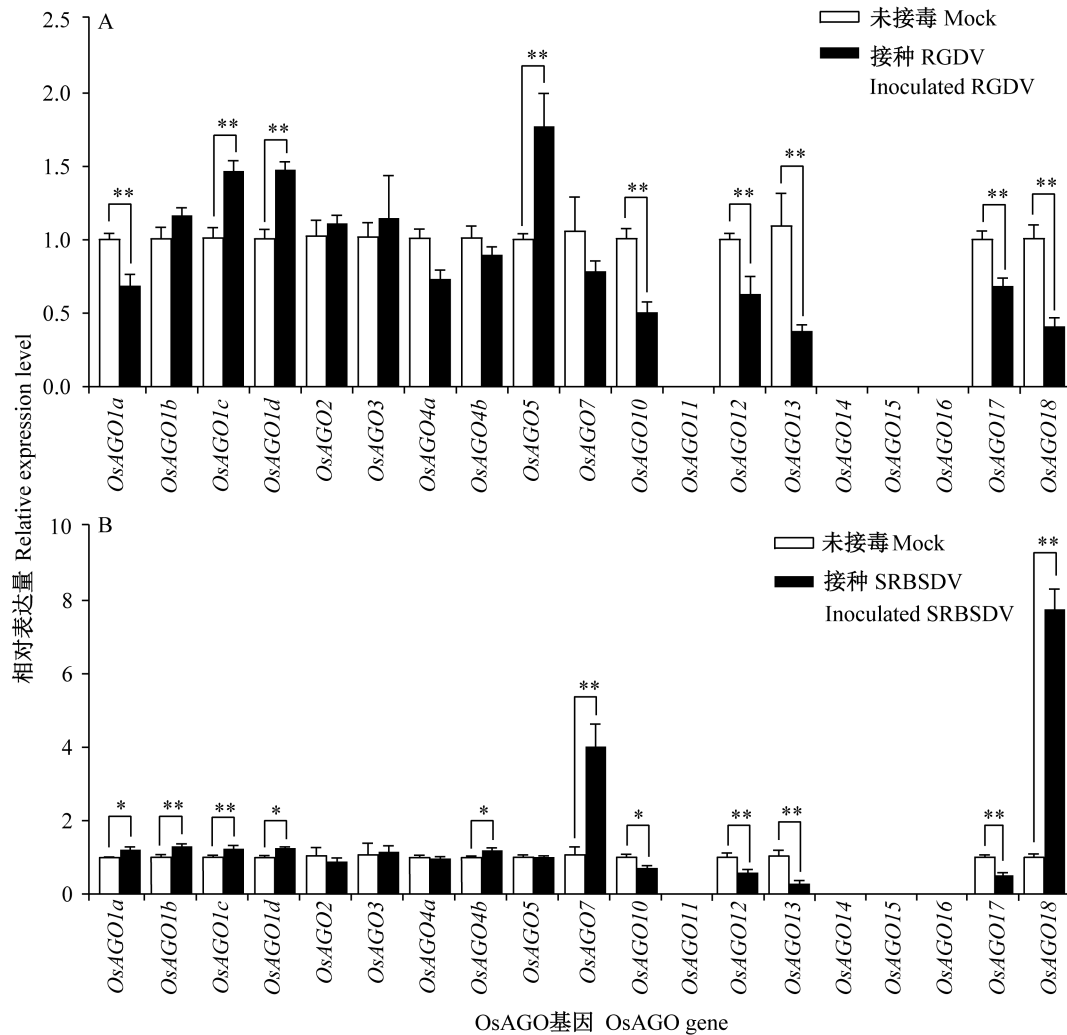


图5 RGDV(A)和SRBSDV(B)侵染后水稻中OsAGO基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of OsAGO gene in rice infected with RGDV (A) and SRBSDV (B)

图中数据为平均数±标准误。\*和\*\*表示处理与对照之间经独立样本t检验法检验差异显著( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。Data are mean±SE. \* or \*\* indicates significant difference between treatment and Mock by Student's *t* test ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

本研究初步筛选出对RGDV和SRBSDV有响应的OsAGO基因,为解析OsAGO在水稻抗病毒中的功能提供基础数据。下一步可获取响应病毒侵染的OsAGO转基因材料,接种RGDV和SRBSDV后统计发病率,检测病毒积累量,并对OsAGO的抗病毒功能进行深入研究。

## 参考文献 (References)

- Carbonell A, Carrington JC. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, 27: 111-117
- Chen XY, Fang RX. 2014. The study of plant viruses in China during the last 40 years. *Microbiology China*, 41(3): 437-444 (in Chinese) [陈晓英, 方荣祥. 2014. 中国植物病毒研究40年. 微生物



- 学通报, 41(3): 437-444]
- Fan HZ, Zhang SG, He XZ, Xie SD, Liu CZ, Zhou LG, Zhu D, Liu XR. 1983. Rice gall dwarf: a new virus disease epidemic in the west of Guangdong Province of South China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 13(4): 1-6 (in Chinese) [范怀忠, 张曙光, 何显志, 谢双大, 刘朝祯, 周亮高, 朱东, 刘显荣. 1983. 水稻瘤矮病: 广东湛江新发生的一种水稻病毒病. *植物病理学报*, 13(4): 1-6]
- Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, Garcia Ruiz MT, McGinn MG, Lowery N, et al. 2015. Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathogens*, 11(3): e1004755
- Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstädt S, Carr JP, Baulcombe DC. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE*, 6(1): e14639
- Hur JK, Zinchenko MK, Djuranovic S, Green R. 2013. Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3' end interactions with the N-terminal lobe. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(11): 7829-7840
- Kwak PB, Tomari Y. 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(2): 145-151
- Li ZB. 2019. The mechanism of synergism between southern rice black-streaked dwarf virus and rice ragged stunt virus. PhD thesis. Guangzhou: South China Agricultural University (in Chinese) [李战彪. 2019. 南方水稻黑条矮缩病毒与水稻齿叶矮缩病毒协同作用机理研究. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学]
- Mao QZ. 2017. Horizontal and vertical transmission mechanisms of rice gall dwarf virus by its insect vector. PhD thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [毛倩卓. 2017. 水稻瘤矮病毒经介体昆虫水平和垂直传播的机制. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant Cell*, 14(3): 629-639
- Sheng C, Li X, Xia SG, Zhang YM, Yu Z, Tang C, Xu L, Wang ZY, Zhang X, Zhou T, et al. 2023. An OsPRMT5-OsAGO2/miR1875-OsHXX1 module regulates rice immunity to blast disease. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(4): 1077-1095
- Shi CL, Zhang J, Wu BJ, Jouni R, Yu CX, Meyers BC, Liang WQ, Fei QL. 2022. Temperature-sensitive male sterility in rice determined by the roles of AGO1d in reproductive phasiRNA biogenesis and function. *New Phytologist*, 236(4): 1529-1544
- Song JJ, Joshua-Tor L. 2006. Argonaute and RNA: getting into the groove. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1): 5-11
- Tolia NH, Joshua-Tor L. 2007. Slicer and the argonautes. *Nature Chemical Biology*, 3(1): 36-43
- Wang AJ, Shu XY, Jiang YQ, Zheng AP, Li P, Yin DS. 2023. Recent progresses on molecular mechanisms in the interactions between rice and pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IA. *Journal of Plant Protection*, 50(1): 11-21 (in Chinese) [王爱军, 舒新月, 蒋钰琪, 郑爱萍, 李平, 殷得所. 2023. 水稻与纹枯病菌互作的分子机制研究进展. *植物保护学报*, 50(1): 11-21]
- Wang L, Lin ZX, Tang JY, Long ML, Xie MC. 2018. Occurrence of pests on crops in Guangxi in 2017. *Guangxi Plant Protection*, 31(3): 30-39 (in Chinese) [王丽, 林作晓, 唐洁瑜, 龙梦玲, 谢茂昌. 2018. 2017年广西农作物病虫害发生实况. *广西植保*, 31(3): 30-39]
- Wang ZY, Chen DY, Sun F, Guo W, Wang W, Li XJ, Lan Y, Du LL, Li S, Fan YJ, et al. 2021. ARGONAUTE 2 increases rice susceptibility to rice black-streaked dwarf virus infection by epigenetically regulating *HEXOKINASE 1* expression. *Molecular Plant Pathology*, 22(9): 1029-1040
- Wu JG, Yang RX, Yang ZR, Yao SZ, Zhao SS, Wang Y, Li PC, Song XW, Jin L, Zhou T, et al. 2017. ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nature Plants*, 3: 16203
- Wu JG, Yang ZR, Wang Y, Zheng LJ, Ye RQ, Ji YH, Zhao SS, Ji SY, Liu RF, Xu L, et al. 2015. Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *eLife*, 4: e05733
- Yang ZR, Huang Y, Yang JL, Yao SZ, Zhao K, Wang DH, Qin QQ, Bian Z, Li Y, Lan Y, et al. 2020. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice. *Cell Host & Microbe*, 28(1): 89-103
- Zhang H, Xia R, Meyers BC, Walbot V. 2015. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, 27: 84-90
- Zhang HH, Li YJ, Sun ZT, Yan F, Chen JP. 2022. Recent advances in the studies of rice virus-plant host interaction. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 33-41 (in Chinese) [张合红, 李雁军, 孙宗涛, 燕飞, 陈剑平. 2022. 水稻病毒与植物寄主互作研究新进展. *植物保护学报*, 49(1): 33-41]
- Zhang ZH, Liu XY, Guo XW, Wang XJ, Zhang XR. 2016. *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nature Plants*, 2(5): 16049
- Zhong J, He WJ, Peng Z, Zhang H, Li F, Yao JL. 2020. A putative AGO protein, OsAGO17, positively regulates grain size and grain weight through OsmiR397b in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 18(4): 916-928
- Zhuang XJ, Xu HM, Gan HF, He Z, Liu F, Zhang K. 2020. Research progress of identification of common rice virus diseases in China. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 61(9): 1821-1832 (in Chinese) [庄新建, 徐红梅, 甘海峰, 贺振, 刘芳, 张坤. 2020. 中国常见水稻病毒病鉴定方法研究进展. *浙江农业科学*, 61(9): 1821-1832]

(责任编辑:张俊芳)