

甘蔗条纹花叶病毒 P3 蛋白与甘蔗 Rubisco 大亚基互作研究

朱海龙, 程光远, 彭 磊, 柴 哲, 郭晋隆, 许莉萍, 徐景升*

(福建农林大学 农业部福建甘蔗生物学与遗传改良重点实验室, 福州 350002)

摘 要: 该研究以甘蔗条纹花叶病毒(*Sugarcane streak mosaic virus*, SCSMV)的 P3 蛋白(SCSMV-P3)为诱饵, 采用酵母双杂交技术(yeast two-hybrid system, Y2HS)从甘蔗酵母文库中筛选到 1 个编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)大亚基的基因, 命名为 *ScRbcL*。序列分析表明, 该基因开放读码框(open reading frame, ORF)长度为 1 337 bp, 编码 478 个氨基酸残基。Y2HS 和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)实验表明, *ScRbcL* 与 SCSMV-P3 存在互作关系。研究认为 SCSMV-P3 与 *ScRbcL* 的互作可能是 SCSMV 侵染甘蔗导致花叶症状发生的分子基础。

关键词: 甘蔗条纹花叶病毒; P3 蛋白; Rubisco; 互作

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Interaction between Sugarcane Streak Mosaic Virus P3 and Rubisco Large Subunit from Sugarcane

ZHU Hailong, CHENG Guangyuan, PENG Lei, CHAI Zhe, GUO Jinlong, XU Liping, XU Jingsheng*

(Key Lab of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) is one of the causative agents of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) mosaic disease. In this study a sugarcane cDNA library was screened with P3 from SCSMV as bait using yeast two-hybrid system (Y2HS). A gene encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) was obtained and designed as *ScRbcL*. The open reading frame (ORF) of *ScRbcL* is 1 337 bp in length and codes for 478 amino acids. The interaction between the *ScRbcL* and SCSMV-P3 was identified by Y2HS and bimolecular fluorescence complementation (BiFC). This research provided new cues to the investigation of the molecular mechanism of SCSMV infection on sugarcane, especially on the mosaic syndrome development caused by sugarcane mosaic disease.

Key words: SCSMV; P3 protein; Rubisco; interaction

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是中国乃至全世界最重要的糖料作物和能源作物之一, 甘蔗糖占中国食糖总量的 92%, 占世界食糖总量的 74%, 甘蔗乙醇占世界生物质燃料乙醇的 60%。甘蔗花叶病(sugarcane mosaic disease, SMD)是严重危害

甘蔗生产的病毒性病害之一, 在全世界各大蔗区普遍发生^[1-5]。甘蔗感染花叶病后, 叶片出现黄绿相间、大小不一的条纹或斑驳; 生长缓慢, 植株矮小; 品质变劣, 蔗糖结晶率下降; 种苗萌芽率下降, 分蘖减少。当 SMD 发病率达 50% 以上时, 蔗糖产量损失

收稿日期: 2013-12-23; 修改稿收到日期: 2014-03-01

基金项目: 国家 863 课题(2013AA102604); 国家自然科学基金(31171605, 31371688)

作者简介: 朱海龙(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物蛋白组学研究。E-mail: zhuhailong629@126.com

* 通信作者: 徐景升, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事甘蔗分子生物学研究。E-mail: xujingsheng@126.com

12% ~ 37%^[6]。SMD 的病原主要有 3 种,即甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*,SCMV)、高粱花叶病毒(*Sorghum mosaic virus*,SrMV)和甘蔗条纹花叶病毒(*Sugarcane streak mosaic virus*,SCSMV),均属于马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)。其中,SCMV 和 SrMV 属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。SCSMV 于 1978 年在美国首次发现并报道,1998 年确定其属于 *Potyviridae*^[7],2012 年国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses,ICTV)将其立为该科新属,即禾病毒属(*Poacevirus*)(<http://www.ictvonline.org>)。该病毒主要分布在孟加拉、印度、日本、印度尼西亚、巴基斯坦等地^[8-9],在中国甘蔗主产区广西、云南、广东、浙江、福建等地普遍发生并广泛传播^[1,10]。

SCSMV 是单链正义 RNA 病毒,基因组结构与 *Potyvirus* 病毒相同,编码 11 个成熟蛋白^[7,11],其中 P3 蛋白是 *Potyviridae* 病毒中研究比较多的蛋白,该蛋白功能复杂,参与病毒的复制、翻译、胞间移动等过程^[12]。病毒结构简单,必须借助寄主因子才能完成侵染过程,因此,分离参与病毒复制、翻译、移动和长距离运输等生物学过程的寄主因子基因对研究病毒侵染的分子机制具有重要意义。本研究以 SC-SMV 的 P3 蛋白为诱饵,利用酵母双杂交技术(yeast two-hybrid system,Y2HS),从甘蔗酵母文库中筛选到 1 个编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase,Rubisco)大亚基基因,命名为 *ScRbcL*。利用 Y2HS 和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation,BiFC)技术验证了 *ScRbcL* 与 SCSMV-P3 的互作关系,为探讨 SCSMV 侵染甘蔗导致花叶症状的分子机理提供了实验证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为甘蔗热带种原始栽培种 Badila,由农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室提供,种植于温室内。本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)种植于培养室内。

1.2 实验方法

1.2.1 甘蔗 Rubisco 大亚基基因克隆及生物信息学分析 以 SCSMV 的 P3 蛋白为诱饵,利用 Y2HS 方法从甘蔗 cDNA 文库(由农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室构建并保存)中筛选到一个互作因子基因。将该克隆测序后,使用 NCBI(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)站点上的在线软件 ORF

finder 预测开放读码框(open reading frame,ORF),采用 Blast 进行同源分析,筛选同源序列并用 Clustal W 进行多序列比对,利用 MEGA 4.0 构建进化树。

1.2.2 ScRbcL 与 SCSMV-P3 的 Y2HS 载体构建及互作验证 将 *ScRbcL* 和 SCSMV-P3 基因分别克隆到 pMD19-T 载体中,命名为 pMD-*ScRbcL* 和 pMD-SCSMV-P3。使用 PCR 引物 SC-P3-pBT-F、SC-P3-pBT-R, *ScRbcL*-pPR3-F、*ScRbcL*-pPR3-R(表 1),分别以含有目的基因的质粒 pMD-*ScRbcL*、pMD-SCSMV-P3 为模板,经 PCR 扩增得到含有 *Sfi* 酶切位点的目的片段,回收并克隆到 pMD19-T 载体。测序验证正确后,用 *Sfi* 酶切,回收目的条带,利用 *T₄* DNA 连接酶将其分别与同样酶切回收的酵母双杂交载体 pBT3-N、pPR3-N 进行连接。连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,分别涂布于含有 LB/Kan⁺、LB/Amp⁺的固体培养基上,37 °C 培养 16 h,挑单菌落分别在 LB/Kan⁺、LB/Amp⁺液体培养基中培养 6 h,提取重组质粒 pBT3-N-SCSMV-P3 和 pPR3-N-*ScRbcL*,采用酶切和 PCR 产物测序方法对重组酵母表达载体进行鉴定与验证。

分别将重组质粒组合 pBT3-N-SCSMV-P3 与 pPR3-N-*ScRbcL*,阳性对照质粒组合 pTSU2-APP 与 pNubG-Fe65,阴性对照质粒组合 pBT3-N 与 pPR3-N,pBT3-N-SCSMV-P3 与 pPR3-N,pBT3-N 与 pPR3-N-*ScRbcL* 转化酵母细胞,30 °C 250 r/min 培养至 OD₅₄₆ 达到 0.6~0.8,将转化后的酵母细胞 5 倍梯度稀释,在 SD-Leu/Trp 固体培养基上培养,培养基表面涂布 10 μ L 20 mg/mL X-gal,30 °C 倒置培养 4~5 d。待菌落长到直径为 3~4 mm 左右后,挑取单菌落转移到 1 mL SD-Trp/Leu/His/Ade 液体培养基中培养,如果酵母生长,将其转移到 SD-Trp/Leu/His/Ade 固体培养基上培养,培养基表面涂布 10 μ L 20 mg/mL X-gal,观察菌落生长状况,验证蛋白之间是否存在互作。

1.2.3 ScRbcL 与 SCSMV-P3 的 BiFC 载体构建及互作验证 分别以克隆载体 pMD-*ScRbcL*、pMD-SCSMV-P3 为模板,使用 PCR 引物 P3-BiFC-F、P3-BiFC-R,*ScRbcL*-BiFC-F、*ScRbcL*-BiFC-R(表 1)进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段,利用 Gateway BP 反应将目的片段克隆到 pDONR221 载体中。提取重组载体质粒,用 *Mlu* 酶切,按照 Gateway LR 反应体系,将 SCSMV 的 P3 基因克隆到 BiFC 载体 pEarleygate201-

表 1 本研究使用的 PCR 引物
Table 1 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物长度 Product length/bp
SCSMV-P3-F	ATCGAATTGGAGGAGTTTGGCC	990
SCSMV-P3-R	CGCACTTTATGGTTCCTGAGCC	
SC-P3-pBT-F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATCGAATTGGAGGAGTTTGGCC	1 034
SC-P3-pBT-R	TTGACTAAGGCCGAGGCGGCCCGCACTTTATGGTTCCTGAGCC	
ScRbcL-pPR3-F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTCAACCAAAACAGAAAC	1 381
ScRbcL-pPR3-R	TTGACTAAGGCCGAGGCGGCCGCTTATCTATGGTATCCACCGC	
SC-P3-BiFC-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATCGAATTGGAGGAGTTTGGCC	1 042
SC-P3-BiFC-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCACATTTATGGTTCCTGAGCC	
ScRbcL-BiFC-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCACCACAAACAGAAAC	1 389
ScRbcL-BiFC-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTATCTATGGTATCCACCG	

YN 中,将 *ScRbcL* 基因克隆到 BiFC 载体 pEarleygate202-YC 中。pEarleygate201-YN 带有黄色荧光蛋白 (Yellow fluorescence protein, YFP) N 端的 174 个氨基酸, pEarleygate202-YC 带有 YFP 的 65 个氨基酸。采用液氮冻融法将重组质粒转化到农杆菌 EHA105 中。

将转化的农杆菌转移到含有 5 mL LB 培养基 (Rif⁺ 50 μg/mL, Kan⁺ 50 μg/mL) 的试管中, 28 ℃, 200 r/min 培养过夜, 使其终浓度 OD₆₀₀ 达到 1.0。常温下, 5 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL 侵染液 (D-葡萄糖 250 mg, MES 5 mL, Na₃PO₄ · 12H₂O 5 mL, 乙酰丁香酮 5 μL, 加 ddH₂O 至终体积为 50 mL), 重悬菌液, 测量菌液 OD₆₀₀ 并将其调节至 0.1。取含有待互作验证的重组质粒的菌液各 750 μL 加入到 2 mL 无菌离心管中, 混匀, 放置 3~5 h。取生长旺盛、长有 5~7 片叶片的本氏烟, 选择两片大的叶片做好标记, 在叶片背面 (2 个叶脉间) 注射菌液, 正常条件下培养。2~3 d 后取侵染叶片 1~2 cm², 背面朝上, 用德国莱卡 TCS SP2 激光共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 *ScRbcL* 基因克隆及生物信息学分析

以 SCSMV 的 P3 蛋白为诱饵从甘蔗酵母文库中筛选到 1 个编码 Rubisco 的基因, 生物信息学分析表明, 该基因 ORF 长度为 1 337 bp, 编码 478 个氨基酸残基, 是甘蔗 Rubisco 大亚基, 命名为 *ScRbcL*。根据 Blast 结果, 选择禾本科 C₄ 植物甘蔗、高粱 (*Sorghum bicolor*)、玉米 (*Zea mays*)、C₃ 植物大麦 (*Hordeum vulgare*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和水稻 (*Oryza sativa*) Rubisco

的大、小亚基氨基酸序列做多序列比对分析。多序列比对结果表明, 本研究得到的 *ScRbcL* 与 NCBI 上公布的高粱 Rubisco 大亚基 (ABP01448.1) 相似性最高, 为 99.78%, 与甘蔗 (YP_024387.1) 的相似性为 99.58%, 与玉米 (CAA70416.1) 的相似性为 99.16%, 与水稻 (BAA00539.1) 的相似性最低, 为 93.72%。进化树分析结果表明, Rubisco 大、小亚基分别聚在一起, 形成 2 个明显不同的群, C₃ 植物和 C₄ 植物 Rubisco 的大、小亚基形成不同的亚群 (图 1)。

2.2 *ScRbcL* 与 SCSMV-P3 互作的 Y2HS 验证

ScRbcL 基因长度为 1 337 bp, 其重组表达载体质粒 pPR3-N-*ScRbcL* 经 *Sfi* 酶切后, 电泳结果显示在 1 500 bp 的位置出现单一条带, 与预期相符。SCSMV-P3 蛋白编码序列长度为 990 bp, 其重组表达载体质粒 pBT3-N-SCSMV-P3 经 *Sfi* 酶切后, 电泳结果显示, 在 1 000 bp 左右的位置出现单一条带, 与预期相符 (图 2)。测序结果也表明目的基因插入到正确位置, 说明载体构建成功。

重组酵母表达载体 pPR3-N-*ScRbcL* 和 pBT3-N-SCSMV-P3 共转化的酵母菌株 NMY51 在四选择性培养基 SD-Trp/Leu/His/Ade 上生长良好。同时, 作为对照的阳性对照菌株生长良好, 阴性菌株不能生长 (图 4)。

2.3 *Sc-RbcL* 与 SCSMV-P3 互作的 BiFC 验证

PCR 扩增重组质粒 Yn-*ScRbcL*、Yc-*ScRbcL*、Yn-SCSMV-P3、Yc-SCSMV-P3 的插入片段, 电泳检测表明扩增产物长度与预期大小一致 (图 3)。测序结果也表明目的序列插入到载体的正确位置, 证明载体构建成功。

剪取共侵染的本氏烟叶片, 激光共聚焦显微镜

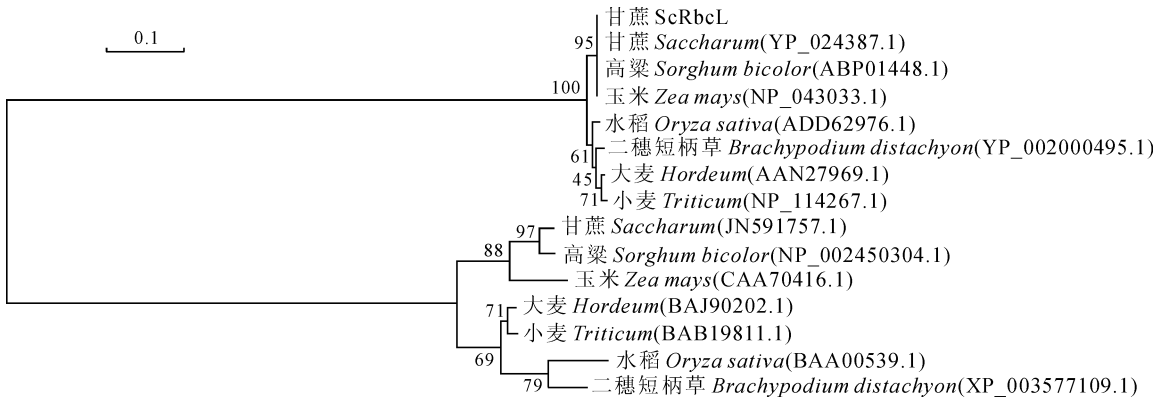


图 1 甘蔗和其他近缘禾本科植物 Rubisco 蛋白的进化树分析

分支点数字表示 Bootstrap 验证中基于 8 000 次重复该节点可信度

Fig. 1 Phylogenetic analysis based on Rubisco amino acid sequences from sugarcane and other poaceous species
The number at the nodes represents the reliability percent of bootstraps values based on 8 000 replications

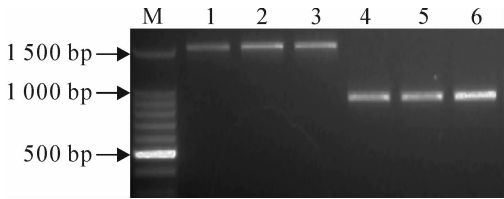


图 2 重组质粒 pBT3-N-SCSMV-P3 和 pPR3-N-ScRbcL 的 Sfi 酶切验证

Fig. 2 Recombinant plasmid pBT3-N-SCSMV-P3 and pPR3-N-ScRbcL digested by Sfi enzyme
M, 100 bp DNA ladder; 1~3, pPR3-N-ScRbcL; 4~6, pBT3-N-SCSMV-P3

下观察,结果表明,在本氏烟表皮细胞的核区出现强烈的黄色荧光信号,证明了 Sc-RbcL 与 SCSMV-P3 蛋白之间的互作关系(图 5)。

3 讨 论

在高等植物中,Rubisco 由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成,大亚基由叶绿体基因组编码,小亚基则由核基因组编码。Rubisco 在植物光合作用过程中既参与 CO₂ 的固定,也参与光呼吸代谢途径,是决定植物净光合的关键酶^[13-16]。Rubisco 的含量、活化程度等因素影响光合速率^[17-19],其活化程度受 Rubisco 活化酶(rubisco activase, RCA)^[20]和磷酸糖类物质调控^[21]。磷酸糖类抑制物与 Rubisco 结合后,Rubisco 变成封闭型构象,其 N 端结构域中的 Glu60、loop-6 中的 Lys334 和磷酸糖基键之间相互作用,限制 Rubisco N 端结构域的移动,导致 Rubisco 活性下降^[22-23]。

当 SCSMV 侵染甘蔗后,很可能由于 P3 蛋白与

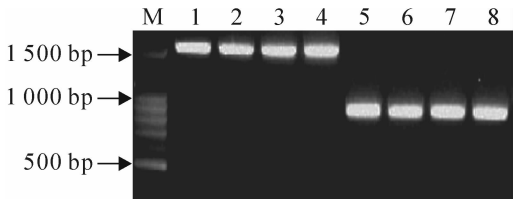


图 3 用于 BiFC 互作验证的重组质粒的 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of the recombinant plasmids used in BiFC

M, 100 bp DNA ladder; 1, 2, Yn-ScRbcL; 3, 4, Yc-ScRbcL; 5, 6, Yn-SCSMV-P3; 7, 8, Yc-SCSMV-P3

Rubisco 大亚基互作,阻碍了 RCA 的活化态氨基酸残基与 Rubisco 大亚基 N 端结构域的相互识别,使 Rubisco 无法变成开放型构象,导致 Rubisco 失活。Rubisco 失活会导致两种情况,一种是反应向 CO₂ 固定方向移动,光呼吸被抑制而产生过量乙醇酸^[16],对植物产生毒害而使叶绿体破坏,叶片失绿,产生花叶症状。另一种可能是阻止 CO₂ 固定,从而减少了 3-磷酸甘油酸的生成,导致糖酵解反应底物不足,产生的 ATP 大量减少^[24-25],无法为叶绿体中各个耗能反应提供足够能量,最终导致类囊体膜降解,叶片失绿。

植物的 Rubisco 与马铃薯 Y 病毒科病毒的 P3 蛋白的互作很可能是一种普遍存在现象。在洋葱中,Rubisco 大亚基和小亚基都可以跟马铃薯 Y 病毒属芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)的 P3、P3NPIPO 分别互作^[26]。在烟草中,Rubisco 大亚基可与马铃薯 Y 病毒的 CP 互作,可能也是影响叶绿体结构造成花叶症状的因素之一^[27]。叶绿体是一个动态的细胞器,细胞核里编码的蛋白不断地

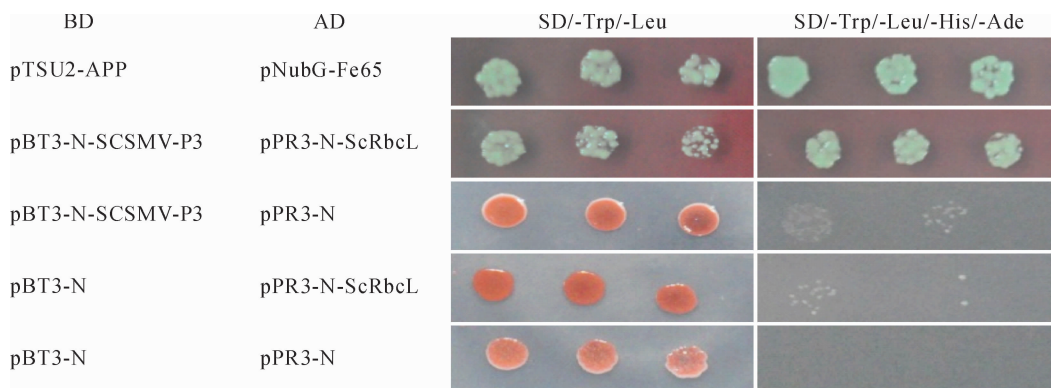


图4 ScRbcL 和 SCSMV-P3 蛋白互作酵母双杂交验证

BD(pTSU2-APP、pBT3-N-SCSMV-P3、pBT3-N)和 AD(pNubG-Fe65、pPR3-N-ScRbcL、pPR3-N)分别代表 DNA 结合结构域(DNA-binding domain)和转录激活结构域(transcription-activating domain)。pBT3-N 为诱饵载体, pPR3-N 为捕获载体。诱饵载体 pTSU2-APP 和捕获载体 pNubG-Fe65 为阳性对照。缺陷型培养基 SD/-Trp/-Leu 缺少色氨酸、亮氨酸, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 缺少色氨酸、亮氨酸、组氨酸和腺嘌呤。阳性对照在涂有 X-gal 四缺板上生长成蓝色菌斑

Fig. 4 Verification of interaction between ScRbcL and SCSMV-P3 by Y2HS

BD(pTSU2-APP、pBT3-N-SCSMV-P3、pBT3-N) and AD (pNubG-Fe65、pPR3-N-ScRbcL、pPR3-N) represent genes fused with GAL4 binding and activation domains, respectively. pBT3-N and pPR3-N represent for bait and prey, respectively. The bait pTSU2-APP and the prey pNubG-Fe65 are used as positive controls. SD/-Trp/-Leu and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade correspond to double dropout medium lacking Trp and Leu and quadruple dropout medium lacking Trp, Leu, His and Ade, respectively. Positive interactions result in yeast growth on the SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade plus X-gal plate and the development of the blue color

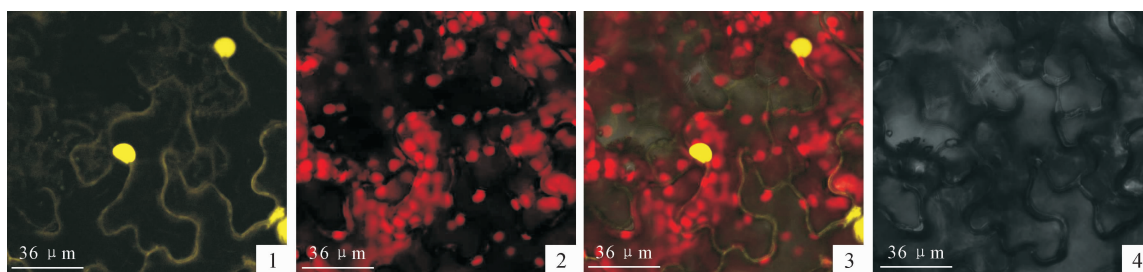


图5 本氏烟叶片表皮细胞中 ScRbcL 和 SCSMV-P3 互作的 BiFC 验证

1. 黄色荧光蛋白信号检测; 2. 叶绿体自发荧光信号检测(红色); 3. 黄色荧光与叶绿体自发荧光重叠; 4. 明视场

Fig. 5 Verification of interaction between SCSMV-P3 and ScRbcL in *N. benthamiana* leaf epidermis

1. Detection of YFP fluorescence (yellow); 2. Detection of chlorophyll autofluorescence (red);

3. YFP/chlorophyll autofluorescence overlay; 4. Bright-field

进入叶绿体,以此维持叶绿体的正常功能^[28]。SCSMV 侵染甘蔗后,除了 P3 蛋白与 Rubisco 互作外,推测病毒编码的其他蛋白也会与寄主因子互作,由此造成叶绿体的结构和功能的不稳定,最终导致叶绿素的缺失,但是目前还未见到有关 SCSMV 与甘

蔗互作的研究报道。综上,本研究首次证明了甘蔗中 Rubisco 大亚基与 SCSMV 的 P3 蛋白的互作,为研究 SCSMV 侵染甘蔗造成花叶病症状的分子机制提供了实验证据。

参考文献:

- [1] YAN M X(颜梅新), HUANG W H(黄伟华), DENG ZH Y(邓展云), *et al.* Investigation of *Sugarcane mosaic virus* infecting sugarcane in Guangxi[J]. *Sugar Crops of China* (中国糖料), 2012, 1(1): 50-57 (in Chinese).
- [2] XIONG G R(熊国如), ZHANG Y L(张雨良), ZHAO T T(赵婷婷), *et al.* The varieties and molecular identification of viral diseases in sugarcane cultivating in Hainan Province[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops* (热带作物学报), 2011, 32(12): 2 307-2 311 (in Chinese).
- [3] LI Y Q, LIU R Y, ZHOU T, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Sugarcane mosaic virus*[J]. *Virus Research*, 2013, 171(1):

242—246.

- [4] WU L, ZU X, WANG S, *et al.* Sugarcane mosaic virus—Long history but still a threat to industry[J]. *Crop Protection*, 2012, **42**(1): 74—78.
- [5] JOYCE P, MCQUALTER R, HANDLEY J, *et al.* Transgenic sugarcane resistant to *Sugarcane mosaic virus*: proceedings of the proceedings-australian society of sugar cane technologists, F[C]. New South Wales, Australia: Watson Ferguson and Company, 1998: 204—210.
- [6] ZHANG X Y(张显勇), CAI W W(蔡文伟), YANG B P(杨本鹏), *et al.* Development of a multiplex PCR protocol for the detection of SCMV and *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane RSD[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2008, **41**(12): 4 321—4 327 (in Chinese).
- [7] HALL J S, ADAMS B, PARSONS T J, *et al.* Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new potyvirus: *Sugarcane streak mosaic virus*, and a reevaluation of the classification of the Potyviridae[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, **10**(3): 323—332.
- [8] LI W, HE Z, LI S, *et al.* Molecular characterization of a new strain of *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV)[J]. *Archives of Virology*, 2011, **156**(11): 2 101—2 104.
- [9] XU D, PARK J, MIRKOV T, *et al.* Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China[J]. *Archives of Virology*, 2008, **153**(6): 1 031—1 039.
- [10] WANG X Y(王晓燕), LI W F(李文凤), HUANG Y K(黄应昆), *et al.* Research progress on sugarcane mosaic disease[J]. *Sugar Crops of China* (中国糖料), 2009, 4: 61—64 (in Chinese).
- [11] CHUNG B Y, MILLER W A, ATKINS J F, FIRTH A E. An overlapping essential gene in the Potyviridae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**(15): 5 897—5 902.
- [12] CUI X Y(崔晓艳), CHEN X(陈 新), GU H P(顾和平), *et al.* The functional characterization of Potyvirus-encoded P3 and P3-PiPo protein[J]. *Microbiology China* (微生物学通报), 2012, **39**(1): 99—105 (in Chinese).
- [13] ASHIDA H, DANCHIN A, YOKOTA A. Was photosynthetic Rubisco recruited by acquisitive evolution from Rubisco-like proteins involved in sulfur metabolism? [J]. *Research in Microbiology*, 2005, **156**(5): 611—618.
- [14] XIONG X R(熊晓然), CHEN W M(陈蔚梅), FENG SH Y(冯胜彦), *et al.* Simulation on botanic Rubisco active center[J]. *Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2003, **19**(4): 493—498 (in Chinese).
- [15] LUNDQVIST T, SCHNEIDER G. Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(19): 12 604—12 611.
- [16] MEI Y(梅 杨), LI H L(李海蓝), XIE J(谢 晋), *et al.* Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)[J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学通讯), 2007, **43**(2): 363—368 (in Chinese).
- [17] MACHLER F, NOSBERGER J. Regulation of Rubisco activity in intact wheat leaves by light, CO₂ and temperature[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1980, **31**(2): 1 485—1 491.
- [18] JIANG D A(蒋德安), XU Y F(徐银发). Internal dominant factors for decline of photosynthesis during rice leaf senescence[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University* (浙江农业大学学报), 1995, **21**(5): 533—538 (in Chinese).
- [19] ZHANG G(张国), LI B(李 滨), ZOU Q(邹 琦). Cloning and expression of Rubisco activase gene in wheat[J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2005, **22**(3): 313—319 (in Chinese).
- [20] LEITAO L, MAORET J J, BOLLLEY J P. Changes in PEP carboxylase, Rubisco and Rubisco activase mRNA levels from maize (*Zea mays*) exposed to a chronic ozone stress[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2007, **40**(2): 137—153.
- [21] SALVUCCI M, PORTIS A J, OGREN W. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*[J]. *Photosynthesis Research*, 1985, **7**(2): 193—201.
- [22] LI C S, WANG D F, PORTIS J A. Identification of critical arginine residues in the functioning of Rubisco activase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, **450**(2): 176—182.
- [23] PORTIS J A, LI C S, WANG D F, *et al.* Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**(7): 1 597—1 604.
- [24] LI H X(李海霞), WANG ZH M(王真梅), ZENG H L(曾汗来). The research progresses in Rubisco activase in plant[J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学通讯), 2010, **46**(11): 1 092—1 100 (in Chinese).
- [25] YU L L(于丽丽), GAO C Q(高彩球), WANG Y CH(王玉成), *et al.* Cloning and expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Tamarix hispida*[J]. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), 2010, **38**(7): 105—108 (in Chinese).
- [26] LIN L, ZHAO P L, FEI Y, *et al.* Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) of host plants[J]. *Virus Genes*, 2011, **43**(1): 90—92.
- [27] FEKI S, LOUKILI M, TRIKI-MARRAKCHI R, *et al.* Interaction between tobacco ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Rubisco-LSU) and the PVY Coat Protein (PVY-CP)[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, **112**(3): 221—234.
- [28] DAWSON W O. Tobamovirus-plant interactions[J]. *Virology*, 1992, **186**(2): 359—367.