

# 毛竹小 RNA 高通量测序及病毒分析

范春节<sup>1,2</sup>, 王 晖<sup>1,3</sup>, 卢孟柱<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091; 2. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 3. NERC/Centre for Ecology and Hydrology (CEH) Oxford, Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, UK)

**摘要:**以毛竹叶片为材料,采用小 RNA 高通量测序结合生物信息学对小 RNA 数据库进行组装,进一步分析了毛竹中存在的病毒和类病毒,并采用 RT-PCR 和 RACE 进行验证。结果表明:在竹子样品中存在水稻东格鲁病毒(RTBV),覆盖率达到 91.0%。在毛竹样品中扩增得到 1 992 bp RTBV 病毒类似序列,占其基因组的 24.9%。RTBV 病毒在多个毛竹样品中存在且不存在多态性。RTBV 病毒可能是一个古老的植物病毒,在进化过程中禾本科植物将其序列整合到基因组中来防御 RTBV 病毒的浸染。

**关键词:**毛竹;高通量测序;小 RNA;RTBV 病毒

中图分类号:S795.7 文献标识码:A

## Small RNA Analysis Using High-Throughput Sequencing and Virus Investigation in Bamboo (*Phyllostachys edulis*)

FAN Chun-jie<sup>1,2</sup>, WANG Hui<sup>1,3</sup>, LU Meng-zhu<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China; 3. NERC/Centre for Ecology and Hydrology (CEH), Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, UK)

**Abstract:** The leaves of *Phyllostachys edulis* were harvested for RNA extraction, a sRNA library was constructed and sequenced by using the Solexa high-throughput sequencing technology. Bioinformatics was performed to identify the sRNAs and viruses. RT-PCR and RACE techniques were explored to identify and confirm the viruses or viroid in bamboo. The assembly of sRNA in all samples revealed that a sequence which covered 91.0% of rice tungro bacilliform virus (RTBV) genome existed widely in bamboo samples. Meanwhile, 1 992bp DNA sequence which covered 24.9% of RTBV completed genome was amplified and no polymorphism was observed in this samples. It concluded that RTBV virus may exist in *planta* in ancient time and was late integrated into the plant genomes against the RTBV infection.

**Key words:** *Phyllostachys edulis*; high-throughput sequencing; small RNA; RTBV

野生植物被认为是病毒的天然储存库,其爆发可能会导致农业和种植业的减产。近年来已经从农作物中发现了大量的植物病毒并且进行了基因组测序,但目前大部分的植物病毒仍然是未知的<sup>[1]</sup>。植物在受到病毒浸染时会形成干扰小 RNA (siRNA),

以 RNA 干扰 (RNAi) 方式对靶向病毒核酸多个位点进行降解,来沉默病毒 RNA,使植物可以获得系统性的病毒免疫<sup>[2]</sup>。在这个过程中植物中存在着大量的起源于病毒的 siRNA,通过 Solexa 深度测序和组装可以得到病毒的序列信息,如果测序深度足够可

收稿日期:2012-07-08

基金项目:国家自然科学基金海外及港澳台基金“利用小 RNA 组研究竹子中的抗病毒免疫及其与竹子开花的关系”(201131028004)

作者简介:范春节(1983—),男,河南驻马店人,博士,主要研究方向为植物分子生物学。

\* 通讯作者:研究员,博士,主要研究方向:木材形成的分子基础与分子育种。

以得到完整的病毒序列。利用这种方法检测到温室中培育的甜土豆中感染 2 个已知病毒,证实了这种方法的有效性<sup>[3]</sup>;同时还检测到 2 个未知病毒,这也说明植物中可能存在着大量未知病毒,也表明了这种方法的高灵敏度。目前,高通量的小 RNA 测序技术用于植物病毒和调控生物学过程的 miRNA 发现。如果植物样品中有病毒感染,在获得的 siRNA 序列库中就会含有来源于病毒的序列,并且可以发现植物病毒以及植物抗病毒基因沉默的特点特征,如基因沉默的热点区域等,对抗病性的研究有指导意义。目前,在竹子中发现存在着竹花叶病毒(bamboo mosaic virus, BaMV),竹花叶病的病征主要为叶片呈现黄绿相嵌的斑纹,尤其心叶更是明显。罹病竹株的产笋量减少,品质亦受到很大影响<sup>[4]</sup>。除此之外,在竹子中的相关病毒研究未见报道。本研究以桂林地区野生毛竹为研究对象,从中提取低分子量 RNA,应用 Solexa 高通量测序技术获得大量的小 RNA 序列,通过生物信息学组装小 RNA,预测和发现竹子中存在的病毒或者植物抗病毒序列特征。通过进一步分析竹子抗病毒基因沉默的热点区域,为进一步的抗病性研究提供支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

野生型毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie)材料取自广西壮族自治区桂林市,样品 mix1 和 mix3 取自桂林市灌阳县洞井瑶族乡野猪殿村(25°13'24.38" N, 110°43'13.84" E),样品 mix2、mix4 和 mix5 取自灵川县松江村(25°12'23.33" N, 110°43'13.84" E),样品 mix6 取自桂林市兴安县猫儿山自然保护区(25°80'13.27" N, 110°45'31.52" E),选取 2~3 年生毛竹幼嫩叶片 3~5 片,每个样品至少有 3 株以上,2010 年 5—6 月采样。mix7 为毛竹种子实生苗温室材料,种子取自广西桂林市,2010 年 9 月收获当年种子,将种子种植在中国林业科学研究院温室生长 3 个月,取叶片。所有样品的材料至少取 3 株以上。

### 1.2 方法

将采取的毛竹叶片放在冻存管中,快速放入到液氮中直接保存。按照 Ambion RNA 提取试剂盒步骤分离小分子量和大分子量 RNA,采用 Agilent 2100 bioanalyzer 检测提取小分子量 RNA 的质量和浓度,将检测合格的 2 μg 小分子量 RNA 样品送到华大基

因进行建库测序分析。其中 cDNA 合成采用 invitrogen 公司的 superscriptIII 反转录试剂盒。

采用 RNA 组装软件 SOAP denovo(<http://soap.genomics.org.cn/soapdenovo.html>)进行序列的组装分析。采用病毒库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome.cgi?taxid=10239>)数据与组装结果进行 blast 比对分析。根据比对分析结果以及测序组装序列所在的 RTBV 或 ERTBV 序列的 ORF 区域设计引物。以混合样品为模板利用上述引物,利用 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (TaKaRa)进行序列扩增。采用 clontech 的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 和 Advantage® 2 PCR Kit,得到的片段采用 NucleoTrap® Gel Extraction Kit 试剂盒进行扩增片段的回收。根据扩增序列设计引物,以 mix1~mix7 多个样地的单株毛竹叶片的 cDNA 为模板分别 PCR 扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 小 RNA 群体的基本分析

2.1.1 小 RNA 在各类中的分类 将得到的原始数据进行去接头序列以及去除低质量读序和污染序列等,最终得到确定读序。表 1 所示:7 个样品小 RNA 库都得到超过 20 000 000 的小 RNA 片段,其中,最多的是样品 mix6 得到 32 665 676 个小 RNA 片段,最少的为样品 mix7,为 20 347 893 个。通过与 Genbank 和 Rfam 比对,进行小 RNA 分类。在所有的样品中 rRNA 占的比例较小,其中,最高的为 mix4,为 11.28%,说明样品 RNA 不存在降解,构建的小 RNA 文库是合格的。在所测样品中大部分是未知序列,几乎所有的样品中都超过了 60.0%,原因可能是缺少毛竹的全基因组序列。另外,样品中 miRNA 所占比例较高,除 mix4 外,都超过 10.0%,其中,mix5 样品中的 miRNA 所占比例为 20.91%。除此之外还存在着其他类型的小 RNA 种类,如重复序列、snRNA 和 snoRNA 等,但所占比例较少,都低于 0.5%。

2.1.2 小 RNA 的长度分布 在 7 个小 RNA 文库中里面,18~35 nt 的小 RNA 具体分布比例见图 1。在所有样品中 24 nt 长度的小 RNA 所占比例最高,在 mix7 样品中 24 nt 长度的小 RNA 占到所有小 RNA 的 63.91%,其次为 21 nt 长度的小 RNA,所占比例为 14%~24%。大多数小 RNA 分布在 20~25 nt 区间,占有小 RNA 的 90% 左右;而在 mix7 样品中 20~25 nt 所占比例最高,达到

97.82%。在样品 mix6 中表现与其他样品有些差异,除了在 21~24 nt 一个主分布区域外,在 30~

35 nt 片段长度序列分布较多,占 36.48%,这与其他样品明显不同。

表 1 所有毛竹样品小 RNA 种类的分布

| 分类      | 小 RNA 种类               |                        |                        |                        |                        |                        |                        |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|         | mix1                   | mix2                   | mix3                   | mix4                   | mix5                   | mix6                   | mix7                   |
| 总数      | 25 375 720             | 22 566 966             | 23 703 485             | 21 845 528             | 26 592 728             | 32 665 676             | 20 347 893             |
| 反义外显子   | 12 248<br>(0.05%)      | 6 786<br>(0.03%)       | 10 870<br>(0.05%)      | 8 172<br>(0.04%)       | 9 452<br>(0.04%)       | 7 945<br>(0.02%)       | 10 131<br>(0.05%)      |
| 正义外显子   | 55 709<br>(0.22%)      | 28 847<br>(0.13%)      | 52 677<br>(0.22%)      | 46 212<br>(0.21%)      | 127 727<br>(0.48%)     | 311 956<br>(0.95%)     | 23 261<br>(0.11%)      |
| 反义内含子   | 5 000<br>(0.02%)       | 3 307<br>(0.01%)       | 3 694<br>(0.02%)       | 4 965<br>(0.02%)       | 9 099<br>(0.03%)       | 9 939<br>(0.03%)       | 3 906<br>(0.02%)       |
| 正义内含子   | 59 715<br>(0.24%)      | 10 895<br>(0.05%)      | 16 851<br>(0.07%)      | 14 325<br>(0.07%)      | 27 997<br>(0.11%)      | 43 640<br>(0.13%)      | 9 579<br>(0.05%)       |
| miRNA   | 3 675 779<br>(14.49%)  | 2 875 419<br>(12.74%)  | 3 530 421<br>(14.89%)  | 2 097 793<br>(9.6%)    | 5 559 467<br>(20.91%)  | 3 899 043<br>(11.94%)  | 3 257 552<br>(16.01%)  |
| 核糖体 RNA | 2 652 606<br>(10.45%)  | 1 350 538<br>(5.98%)   | 2 077 666<br>(8.77%)   | 2 464 488<br>(11.28%)  | 2 184 150<br>(8.21%)   | 3 580 611<br>(10.96%)  | 508 850<br>(2.5%)      |
| 重复序列    | 31 749<br>(0.13%)      | 32 496<br>(0.14%)      | 36 307<br>(0.15%)      | 48 983<br>(0.22%)      | 51 227<br>(0.19%)      | 31 625<br>(0.10%)      | 38 000<br>(0.19%)      |
| 核小 RNA  | 11 419<br>(0.04%)      | 6 540<br>(0.03%)       | 9 982<br>(0.04%)       | 69 042<br>(0.32%)      | 67 673<br>(0.25%)      | 131 065<br>(0.4%)      | 5 667<br>(0.03%)       |
| 核仁小 RNA | 9 713<br>(0.04%)       | 4 968<br>(0.02%)       | 6 660<br>(0.03%)       | 77 192<br>(0.35%)      | 70 506<br>(0.27%)      | 97 728<br>(0.3%)       | 3 232<br>(0.02%)       |
| 转运 RNA  | 970 566<br>(3.82%)     | 406 663<br>(1.8%)      | 612 051<br>(2.58%)     | 1 474 898<br>(6.75%)   | 1 937 550<br>(7.29%)   | 13 107 865<br>(40.13%) | 177 389<br>(0.87%)     |
| 未知      | 17 891 216<br>(70.51%) | 17 840 507<br>(79.06%) | 17 346 306<br>(73.18%) | 15 539 458<br>(71.13%) | 16 547 880<br>(62.23%) | 11 444 259<br>(35.03%) | 16 310 326<br>(80.16%) |

注:括号内数据为占总数的百分比。

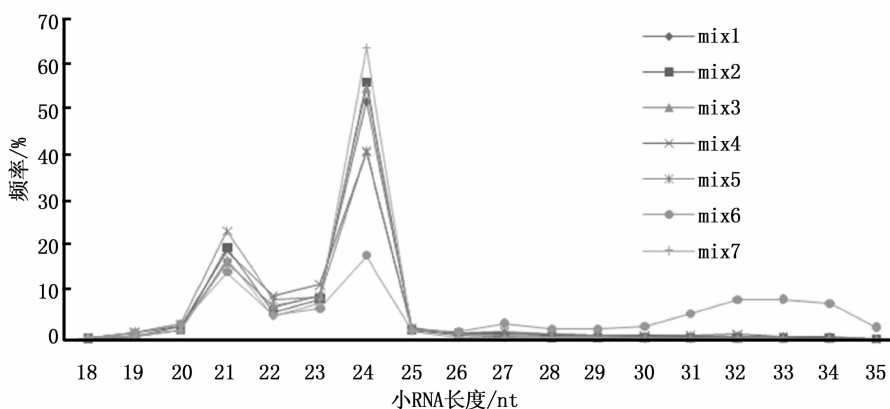
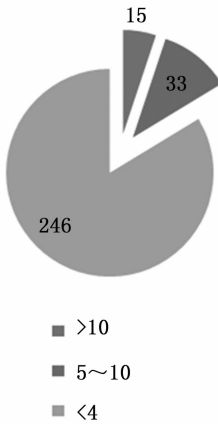


图 1 不同的库中 sRNA 长度的分布

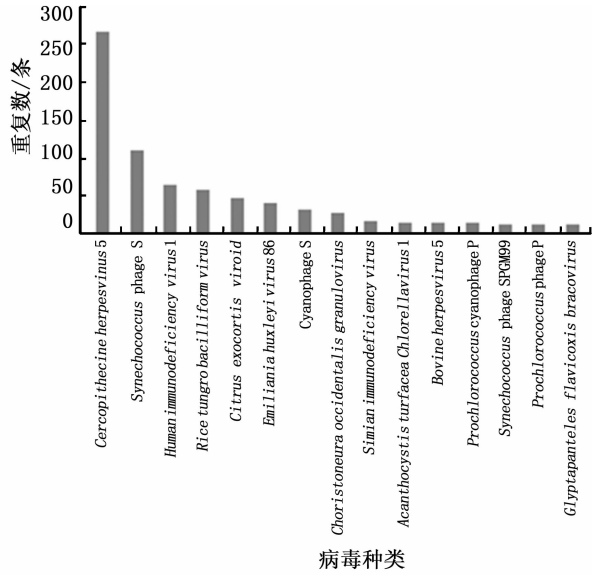
### 2.2 小 RNA 组装结果与分析

采用 SOAP denovo 软件以 17mer 进行小 RNA 序列组装,将组装后的序列与病毒库序列进行比对,在不考虑比对长度的条件下,能够比对上的病毒种类共有 294 种(图 2a)。有 246 种病毒对应的比对序列数量小于 4 个,其中,大多数只有一条比对序列,另外能够比对上 5~10 条序列的病毒有 33 个。

由于比对序列数量较少,推测毛竹的小 RNA 中存在着少量与病毒类似的序列。超过 10 条以上的有 15 种病毒(图 2b),值得关注的是水稻东格鲁病毒(Rice tungro bacilliform virus, RTBV)和柑橘裂皮病类病毒(Citrus exocortis viroid, CEVd),他们的序列比对条数分别达到了 59、48 条(图 2b)。



(a) 病毒序列数量



(b) 病毒序列分类

图2 毛竹数据库中存在的病毒分析

### 2.3 RTBV 病毒的组装与分析

根据在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=RTBV>) 搜索到的信息, RTBV 病毒基因组长度为 8 002 bp, GC 含量为 33.7%, 由 4 个开放可读框组成, 分别定位在基因组 69 ~ 668 bp、665 ~ 997 bp、994 ~ 6 021 bp 和 6 042 ~ 7 211 bp。第 1 个开放可读框编码 1 个 24 kD 的蛋白, 但没有起始密码子 ATG。另外, 在 7 373 ~ 7 379 有一个 TATA 盒子, 在 7 610 ~ 7 616 处有 polyA 尾巴。设定如下参数: 比对长度大于 15 nt, 3 个错配碱基以内,  $e=0.01$ , 进一步与小 RNA 数据库 blast 比对计算样品和 RTBV 的覆盖度(表 2)。所有的样品中

RTBV 覆盖度均大于 80.0%, 覆盖长度最多的是 mix7, 覆盖度达到 90.2%。将 7 个小 RNA 数据库混合在一起比对 RTBV 病毒时, 其覆盖率达到 100%, 初步说明在毛竹样品中存在着 RTBV 病毒。在 mer17 的条件下进行组装后, 除了 mix6 覆盖度为 35.3% 外, 其他样品的覆盖度都大于 40.0%, 混合总样品分析 RTBV 病毒覆盖度达到 88.2%, 说明样品中存在着 RTBV 病毒。在样品 mix5 中组装出最长的序列, 长度为 353 nt, 占 RTBV 病毒总长的 4.4%; 混合样品组装出来的 RTBV 序列最长为 453 nt, 占总长的 5.7%。

表2 水稻东格鲁病毒(RTBV)在样品中的覆盖度分析

| 样品名  | 覆盖长度/nt | 覆盖度/% | 组装后覆盖长度/nt | 组装后覆盖度/% | 组装最长长度/nt | 覆盖度/% |
|------|---------|-------|------------|----------|-----------|-------|
| mix1 | 7 057   | 88.2  | 3 671      | 45.9     | 236       | 2.9   |
| mix2 | 7 040   | 88.0  | 3 539      | 44.2     | 288       | 3.6   |
| mix3 | 7 160   | 89.5  | 3 822      | 47.8     | 227       | 2.8   |
| mix4 | 7 117   | 89.0  | 3 788      | 47.3     | 228       | 2.8   |
| mix5 | 7 038   | 88.0  | 3 568      | 44.6     | 353       | 4.4   |
| mix6 | 6 710   | 83.9  | 2 824      | 35.3     | 154       | 1.9   |
| mix7 | 7 218   | 90.2  | 3 561      | 44.5     | 191       | 2.4   |
| 混合   | 8 002   | 100.0 | 7 060      | 88.2     | 453       | 5.7   |

进一步将所有样品组装出来的序列进行拼接, 结果如图 3 所示: 覆盖率达到 79.0%, 存在几个较小的缺口, 在第 4 个 ORF 中序列覆盖度较高, 几乎不存在缺口。在第 1 个 ORF 区存在着大于 40 倍的重叠率, 而在其他 ORF 区重叠率相对较低, 可能由于

样品是幼嫩的叶片。

### 2.4 RTBV 病毒的验证和分析

2.4.1 PCR 和 RACE 扩增病毒序列 将提取的各样品的总 RNA 分别进行反转录得到的 cDNA, 等量混合后作为模板引物 ERA1 (FP: GATGCTTA-

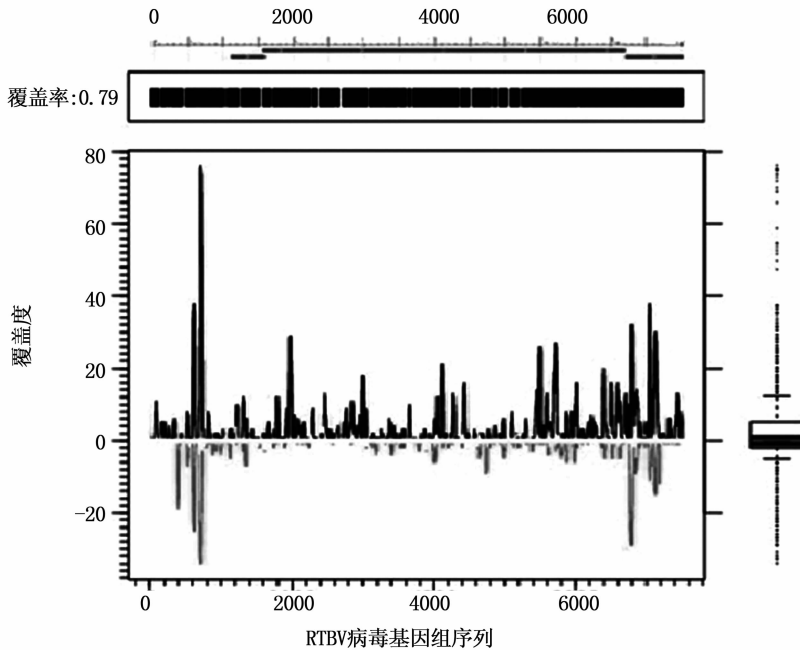


图3 毛竹小 RNA 库中的水稻东格鲁病毒(RTBV)病毒覆盖分析(空白处表示序列缺失)

CAATATTCCAAATA, RP: TTTTCCTTTTATGTGT-TCAAAT)和 ERA2(FP: TGACAATACCATAGATGATGCTT, RP: ACTTTATGACCATTTTCCTGTAA)进行 RT-PCR 扩增,扩增产物长度分别为 1 034、1 009 bp 的序列。比对结果为水稻东格鲁病毒类似序列 A (ERTBV-A),定位在第 2 个 ORF 区域的 5 620 ~ 6 654 bp,同源性达到 81%,氨基酸序列同源性达到 91%。为了得到更长的 RTBV 病毒序列,采用通过 5' RACE 和 3' RACE 扩增出长度为 1 992 bp 的 ERTBV-A 病毒类似序列。将扩增结果与测序组装结果进一步组装,最终达到覆盖率为 91% 的 RTBV,初步证明了在毛竹序列中存在的 RTBV 病毒。

2.4.2 RTBV 病毒的分布及多样性分析 以 ERA1 为引物对 mix1 ~ mix6 不同样地的 32 个样品进行 RT-PCR 扩增,结果表明:其中有 18 个样品存在着 RTBV 病毒序列,且这 18 个样品均匀的分布于 mix1 ~ mix6 样地。在温室取样的材料中也能够扩增出目的片段,说明在毛竹中广泛存在着 RTBV 病毒,这是一个内在的古老的植物病毒,可能在进化过程中整合到毛竹基因组序列中,而且其序列可以表达。为了确认病毒序列是否存在多态性,对 PCR 产物测序并进行分析,结果表明:在毛竹样品中 RTBV 病毒只存在着一种序列,不存在多态性。

### 3 结论与讨论

通过高通量测序和生物信息学组装分析,发现

在野外的竹子样品中存在着 RTBV 病毒序列和 CEVd 类病毒序列,一次组装的结果中 RTBV 病毒的覆盖率达到 79.0%。通过进一步 PCR 和 RACE 扩增,最终得到 1 992 bp RTBV 病毒类似序列,将实验扩增结果与小 RNA 拼接组装最终得到覆盖 91.0% RTBV 病毒的序列。初步认为竹子中存在着 RTBV 病毒类似序列,且不同样品的病毒序列没有多态性。

通过小 RNA 高通量测序的方法从甜土豆中发现植物病毒后,通过高通量测序在模式生物线虫以及果蝇中也发现已知的病毒和新的病毒<sup>[3,5]</sup>。除此之外,通过这种方式在家蚊的研究中也发现了病毒的存在,在竹子感染了 BaTV 病毒后的小 RNA 测序的结果也验证了这种方法的可行性<sup>[6-7]</sup>。在本研究中同样发现高达 90% 以上的 RTBV 病毒覆盖序列,RTBV 病毒是环状双链 DNA 中的花椰菜病毒科(Caulimoviridae)水稻衰退(东格鲁)杆状样病毒属(Tungrovirus Rice tungro bacilli-form-like viruses)的代表种,存在着 4 个开放可读框(ORF),分别编码 24、12、194、46 kD 的蛋白<sup>[8]</sup>,主要在水稻中存在,感染后叶片变黄或变橙色,植株矮化,导致水稻减产,是东南亚水稻限产的主要原因。在水稻中存在着 RTBV 病毒类似的序列,这些序列都是以分散的形式整合在水稻基因组中,通过组装发现在水稻中存在 ERTBV-A、ERTBV-B 和 ERTBV-C 3 类类似序列,长度分别为 7 526、7 496、7 499 bp,这些序列除了缺

乏 RTBV 病毒的 ORF2 区域外,具备其他所有的编码区,而且类似序列 ORFz 区域(RTBV 中是 ORF3)中具有完整的编码 MP、CP、PR、RNase H (RT/RH) 区域<sup>[9]</sup>。在水稻中发现 ERTBV 的拷贝数在不同种之间差异较大,在不易感染 RTBV 亚洲种源的品种中拷贝数较高,而在非洲和拉丁美洲中拷贝数较低,值得注意的是非洲种源的光稃稻(*Oryza glaberrima*)和短舌野生稻(*O. barthii*)是水稻东格鲁病毒的易感品种,因此,可能是在水稻长期的进化过程中通过整合病毒进一步通过形成内源的 siRNA 起到防御病毒的作用。

越来越多的证据也表明,植物中内源的 siRNA 而不是病毒的 siRNA 在植物防御病毒中起着更加重要的作用<sup>[10-12]</sup>,也说明植物中存在病毒类似序列对于植株防御病毒的重要性。在毛竹中也有可能是这些序列嵌合在基因组中,在 RTBV 病毒浸染的时候起作为内源的 siRNA 的起源来抵御 RTBV 病毒对毛竹的侵染。如果这种假设属实,RTBV 病毒可能是一个古老的植物病毒,在进化过程中禾本科植物将其序列整合到基因组中来防御 RTBV 病毒的侵染。在本研究中发现毛竹中存在的 RTBV 病毒类似序列,其覆盖深度较低,可能是由于采取的样品是幼嫩的叶片本身带有的病毒较少的原因,也可能与 RTBV 病毒主要在韧皮部特异作用有关<sup>[13]</sup>。

## 参考文献:

- [1] Wren J D, Roossinck M J, Nelson R S, *et al.* Plant Virus Biodiversity and Ecology[J]. PLoS Biology, 2006, 4: e80
- [2] Ding S W. Direct and Indirect Roles of viral suppressors of RNA silencing in Pathogenesis[J]. Annu Rev Phytopathol, 2008, 44: 26
- [3] Kreuze J F, Perez A, Untiveros M, *et al.* Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses[J]. Virology, 2009, 388: 1-7
- [4] Lin N S, Chai Y J, Huang T Y, *et al.* Incidence of bamboo mosaic potexvirus in Taiwan[J]. Plant disease, 1993, 77: 3
- [5] Wu Q, Luo Y, Lu R, *et al.* Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107: 1606-1611
- [6] Lin K Y, Chang C P, Wang C H, *et al.* Global Analyses of Small Interfering RNAs Derived from Bamboo mosaic virus and Its Associated Satellite RNAs in Different Plants [J]. PLoS ONE, 2010, 5: e11928
- [7] Ma M H, Gong Z, Zhuang L, *et al.* Discovery of DNA Viruses in Wild-Caught Mosquitoes Using Small RNA High throughput Sequencing[J]. PLoS ONE, 2011, 6: e24758
- [8] Hay J M, Jones M C, Blakebrough M L, *et al.* An analysis of the sequence of an infectious clone of rice tungro bacilliform virus, a plant pararetrovirus[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 2615-2621
- [9] Kunii M K, Masanori N, Hironori U, *et al.* Reconstruction of putative DNA virus from endogenous rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution[J]. BMC Genomics, 2004, 5: 80
- [10] Ding S W, Lu R. Virus-derived siRNAs and piRNAs in immunity and pathogenesis[J]. Current Opinion in Virology, 2011, 1: 533-544
- [11] Blevins T, Rajeswaran R, Aregger M, *et al.* Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: 5003-5014
- [12] Ruiz-Ferrer V, Voinnet O. Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 485-510
- [13] Yin Y, Beachy R N. The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. The Plant Journal, 1995, 7: 969-980