

沈红梅,程玉祥. 杨树 *PtrRHH94* 突变体创制及功能初步分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):44-49.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.007

# 杨树 *PtrRHH94* 突变体创制及功能初步分析

沈红梅,程玉祥

(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** RING-H2 家族基因参与植物的多个生物学过程, *PtrRHH94* 是毛果杨木质化组织内高丰度表达的 RING-H2 基因。为了探究 *PtrRHH94* 基因的功能,选择 3 组 *PtrRHH94* 待编辑靶位点,构建相应的 Cas9/gRNA 编辑载体,将其遗传转化毛果杨,得到 10 株转基因幼苗。DNA 测序结果显示,7 株转基因幼苗体内的 *PtrRHH94* 位点被编辑突变,3 株植株被鉴定为 *PtrRHH94* 敲除突变体。与野生型毛果杨幼树相比, *PtrRHH94* 突变体幼树株高增加,茎节数也增多。此外, *PtrRHH94* 突变体木材的纤维长度与野生型相比没有显著差异,表明 *PtrRHH94* 参与了毛果杨茎生长的调控。

**关键词:** 毛果杨; *PtrRHH94*; 突变体; Cas9/gRNA 编辑载体

**中图分类号:** S792.110.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)22-044-05

RING 基因是植物的一个超级基因家族,其编码的氨基酸含有 8 个保守的半胱氨酸/组氨酸残基 (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>9-39</sub>-Cys-X<sub>1-3</sub>-His-X<sub>2-3</sub>-Cys/His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4-48</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys, X 表示任意氨基酸),结合 2 个锌原子形成带状结构<sup>[1]</sup>。拟南芥、苹果及水稻等 RING 超级家族包括经典的 RING 型和修饰的 RING 型,经典的 RING 型分为 RING-HC (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>)、RING-H2 (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>) 亚家族,而修饰的 RING 型有 RING-v、RING-D、RING-G、RING-S/T 等<sup>[2-4]</sup>。RING-H<sub>2</sub> 类型的基因成员数最多,预示其功能的重要性和复杂性。研究发现,拟南芥经典的 RING 型和修饰的 RING 型均有泛素连接酶 E3 活性<sup>[5]</sup>。据报道,RING-H2 亚家族参与植物的多种生物学过程,如激素生物合成<sup>[6-8]</sup>、信号传导<sup>[9]</sup>、逆境响应及光形态建成<sup>[10-13]</sup>等。杨树有 16 个 RING-H2 成员,能在木质部组织内较特异或高丰度表达<sup>[14]</sup>,但是目前这些基因的遗传功能尚未被鉴定。

*PtrRHH94* 是这 16 个 RING-H2 成员之一,其启动子活性集中在毛果杨木质化的茎节组织<sup>[14]</sup>,很可能参与其茎的生长发育。为了鉴定毛果杨 *PtrRHH94* 基因的功能,本研究拟构建 *PtrRHH94* 基

因 Cas9/gRNA 编辑载体,用其遗传转化毛果杨,获得 *PtrRHH94* 基因位点被编辑突变的遗传材料,并基于突变体初步分析 *PtrRHH94* 基因的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

用 1 月龄毛果杨组培苗进行遗传转化,将温室栽培至 3 月龄的毛果杨野生型及转基因幼树用于 *PtrRHH94* 基因突变表型分析。

### 1.2 主要试剂

EX Taq、pMD18-T,购自 TaKaRa 公司;植物基因组 DNA 一步法试剂盒,购自 Biotek 公司;Silica Bead DNA Gel Extraction Kit,购自 Thermo Scientific 公司;E. Z. N. A Plasmid Mini Kit,购自 Omega 公司;KOD-plus,购自 Toyobo 公司;Bsa I、高浓度 T<sub>4</sub> DNA 连接酶,购自 New Lab 公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 植物基因组 DNA 的提取** 植物基因组 DNA 的提取材料为各毛果杨样品叶片,用液氮把叶片研磨成粉末,加入植物基因组 DNA 一步法试剂进行提取,具体操作参照其说明书。

**1.3.2 PCR 扩增** 20 μL PCR 反应体系:13.5 μL 去离子水,2.0 μL dNTP,2.0 μL 10× Buffer,0.5 μL Taq DNA 聚合酶,各 0.5 μL 上下游引物,1.0 μL 模板。扩增条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,58~60 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.3 *PtrRHH94* 基因编辑载体的构建** 在扩增靶

收稿日期:2020-03-10

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31770637)。

作者简介:沈红梅(1994—),女,四川广安人,硕士研究生,主要从事林木遗传与育种研究。E-mail:shenhm@nefu.edu.cn。

通信作者:程玉祥,博士,教授,主要从事林木遗传与育种研究。

E-mail:chengyuxiang@nefu.edu.cn。

位点序列片段 *gRNAT1*、*gRNAT2* 和 *gRNAT3* 时,以稀释 100 倍的 PCBC - DT1T2 质粒为模板,DT1 - BsF、DT2 - BsR、DT1 - F0 和 DT2 - R0 为引物,PCR 扩增后,将产物用琼脂糖电泳区分,切下目的条带的胶,胶内回收的 DNA 片段经 *Bsa* I 酶切、 $T_4$  DNA 连接酶连接到植物基因编辑载体 pHSE401<sup>[15]</sup> 上。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,筛选出含有 pHSE401 - *gRNAT1*/T2/T3 的单菌落,经测序鉴定后,将阳性质粒导入 GV3101 农杆菌,用于毛果杨的转化。

1.3.4 毛果杨遗传转化及转基因植株的鉴定 毛果杨遗传转化采用农杆菌介导法<sup>[16]</sup>,选择 1 月龄毛果杨幼苗,切取第 2 ~ 3 节茎段,长度约为 1 cm,用农杆菌侵染后黑暗共培养 48 h,用无菌水清洗茎段后,移至含有 10 mg/L 潮霉素的分化培养基上。将抗性芽(25 d)移至含有 5 mg/L 潮霉素的生根培养基上。提取转化植株的基因组 DNA 作为模板,用 *zCas9* - R/F、*gRNAT1*/T2/T3 特异引物进行 PCR 扩增鉴定。

1.3.5 转基因植株体内 *PtrRHH94* 基因靶位点的编辑鉴定 以转基因植株基因组 DNA 为模板,用覆盖靶位点的 *PtrRHH94* - R/F 引物进行 PCR 扩增,产物胶回收后连接到 pMD18 - T 载体上,并转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌。将筛选的阳性克隆进行 DNA 测序,再与野生型 *PtrRHH94* 基因序列进行对比,得到靶位点被编辑的情况。

1.3.6 木材纤维长度的测量 取样品幼树第 20 节茎段,剥去树皮,浸泡在解离液(10% 硝酸 + 10% 铬酸)中,60 °C 水浴 7 h,使纤维、导管细胞从木材组织上解离下来,用 1% 酸性品红染色后,在光学显微镜下测量纤维长度,每个样品共统计 200 个纤维细胞。

1.3.7 数据分析 采用 SPSS 17.0 软件中的独立样本 *t* 检验法对株高、茎节数进行差异显著性分析,当  $P < 0.05$  时,表示差异显著。用 Graphpad Prism 5.0 软件对纤维长度分布情况进行制图。

1.3.8 本研究所用引物 本研究所用引物情况见表 1。

表 1 所用引物及序列

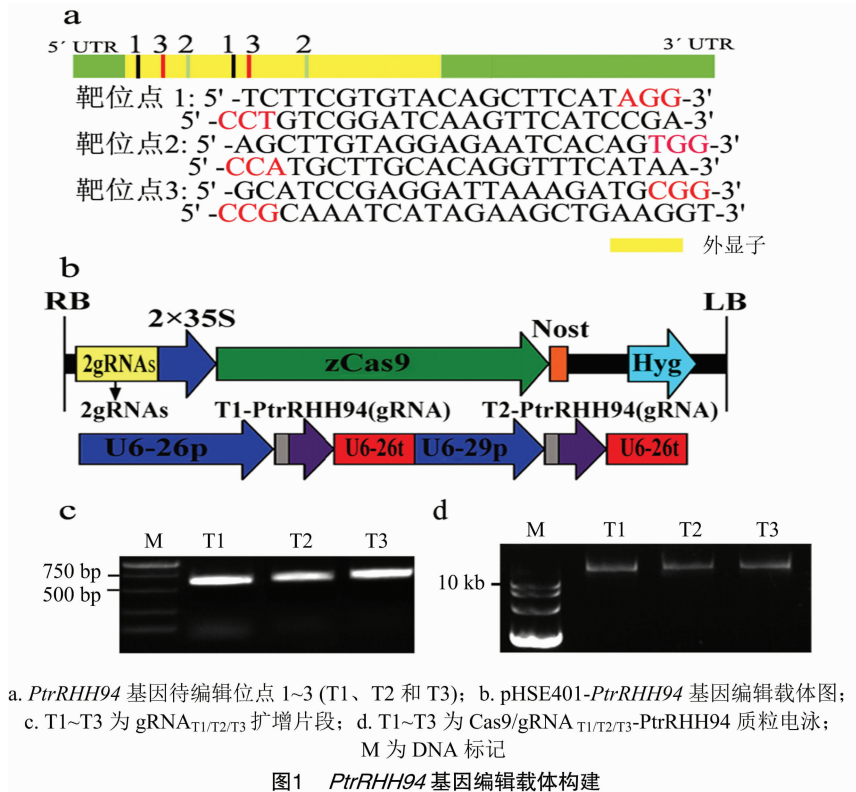
基因	用途	引物名称	引物序列(5'→3')	
<i>PtrRHH94</i>	gRNA <sub>T1</sub>	DT1 - F0	TGCCTTCGTGTACAGCTTCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	
		DT2 - R0	AACGCTCGGATCAAGTTCATCCGCAATCTCTTAGTCGACTCTA	
		DT1 - BsF	ATATATGGTCTCGATTGCCTTCGTGTACAGCTTCATGTT	
		DT2 - BsR	ATTATTGGTCTCTAAACGTCGGATCAAGTTCATCCGC	
		gRNA <sub>T2</sub>	DT1 - F0	ATATATGGTCTCGATTGGCTTGTAGGAGAATCACAGGTT
			DT2 - R0	AACTGCTTGCACAGGTTTCATACAATCTCTTAGTCGACTCTAC
	DT1 - BsF		ATATATGGTCTCGATTGGCTTGTAGGAGAATCACAGGTT	
	DT2 - BsR		ATTATTGGTCTCTAAACTGCTTGCACAGGTTTCATAC	
	gRNA <sub>T3</sub>		DT1 - F0	TGCATCCGAGGATTAAGATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
			DT2 - R0	AACAAATCATAGAAGCTGAAGCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
		DT1 - BsF	ATTATTGGTCTCTAAACAAATCATAGAAGCTGAAGGC	
		DT2 - BsR	ATATATGGTCTCGATTGCATCCGAGGATTAAGATGTT	
<i>zCas9</i>		位点编辑鉴定	<i>PtrRHH94</i> - F	TCCTTCGTGTACAGCTTCATAAGC
			<i>PtrRHH94</i> - R	CCTGTCGGATCAAGTTCATCCGA
	转基因鉴定	<i>zCas</i> - F	TGAGAACATCGTCATTGAGATGG	
		<i>zCas</i> - R	CAGCTTGTCATTCTCATCGTACT	

## 2 结果与分析

### 2.1 pHSE401 - *PtrRHH94* 基因编辑载体的构建

*PtrRHH94* 基因的突变通过 *Cas9*/*gRNA* 基因编辑技术来实现,在 *PtrRHH94* 基因外显子上设计并选出 3 个特异靶位点序列 T1 ~ T3(图 1 - a)。以 pCBC - DT1T2 质粒为模板,分别 PCR 扩增出带有

特异靶位点序列的 *gRNAT1*、*gRNAT2* 和 *gRNAT3* 片段(图 1 - b)。分别割胶回收各片段,用 *Bsa* I 酶切后连接到 pHSE401 植物基因编辑载体上(图 1 - c)。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,提取阳性菌落质粒,进行电泳检测(图 1 - d),测定插入片段的 DNA 序列,得到 *Cas9*/*gRNA* T1/T2/T3 - *PtrRHH94* 编辑载体。将构建的载体导入 GV3101 农杆菌,用

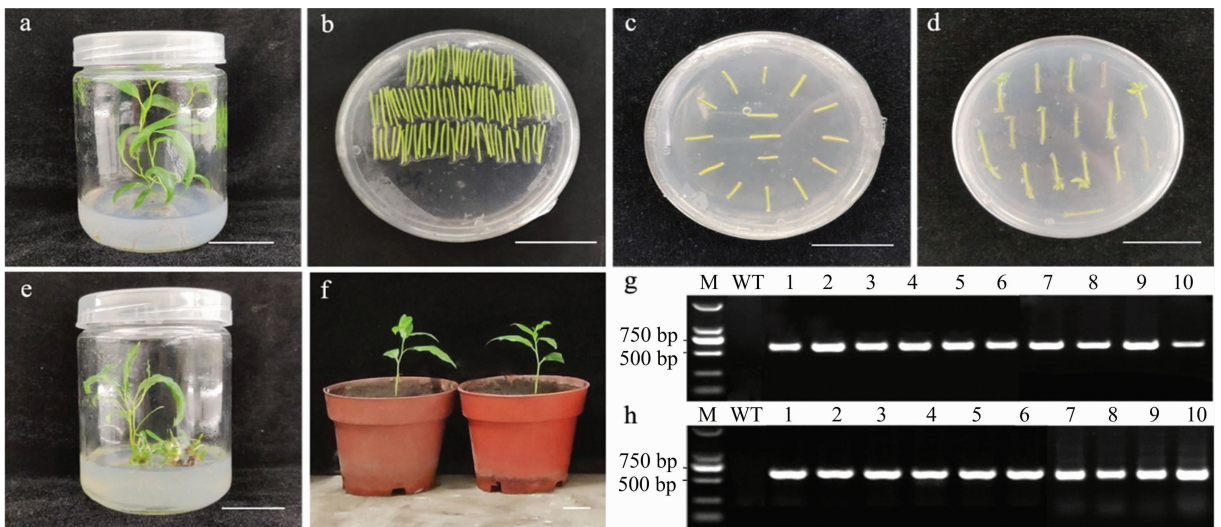
图1 *PtrRHH94* 基因编辑载体构建

于随后的毛果杨遗传转化。

## 2.2 Cas9/gRNA - *PtrRHH94* 转化毛果杨及分子鉴定

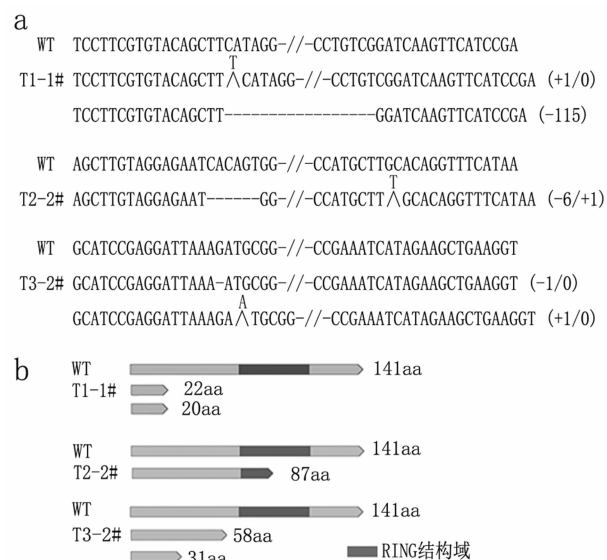
以 1 月龄的毛果杨无菌苗为转化受体, 经过侵染、抗性愈伤形成、抗性愈伤组织分化出芽、抗性芽生根的过程, 转入 Cas9/gRNA<sub>T1/T2/T3</sub> - *PtrRHH94* 基因(图 2 - a ~ 图 2 - f)。盆栽后共得到 10 个转基因抗性株系。以提取的抗性植株基因组 DNA 为模

板, 用 zCas9 引物进行 PCR 扩增鉴定。结果表明, 未被转化的野生型(阴性对照)没有扩增出 zCas9 片段条带, 而 10 株抗性植株均扩增出目标带(图 2 - g)。用 gRNA<sub>T1/T2/T3</sub> 引物进行鉴定, 发现抗性植株均扩增出了目标条带(图 2 - h)。以上结果显示, 这 10 株毛果杨抗性植株中均转入了 Cas9/gRNA<sub>T1/T2/T3</sub> - *PtrRHH94* 基因。

图2 毛果杨 Cas9/gRNA-*PtrRHH94* 转基因及其分子鉴定

### 2.3 靶基因 *PtrRHH94* 编辑突变分析

对 10 株转基因植株进行 *PtrRHH94* 基因靶位点编辑情况鉴定,在跨 T1、T2、T3 靶位点 2 端设计引物,扩增目标片段 DNA,测序后与野生型进行对比。结果显示,7 个株系的 *PtrRHH94* 基因均被编辑,其中 *PtrRHH94* - T1 - 1#、*PtrRHH94* - T2 - 2# 和 *PtrRHH94* - T3 - 2# 植株为双等位编辑(图 3 - a),这 3 个株系中 *PtrRHH94* 的部分碱基插入或删除后,导致 *PtrRHH94* 编码区提前产生终止密码子,推测其氨基酸远短于野生型 *PtrRHH94*(图 3 - b),显示这 3 个株系为 *PtrRHH94* 基因敲除突变体。



a、b. 转基因植株 *PtrRHH94* 基因被编辑及其被编辑后的推测氨基酸  
图3 转基因植株中 *PtrRHH94* 基因靶位点编辑分析

### 2.4 *PtrRHH94* 基因敲除突变体的表型分析

对 *PtrRHH94* - T1 - 1#、- T2 - 2# 和 - T3 - 2# 敲除突变体进行无性扩繁后,与野生型毛果杨一起盆栽于温室中,进行表型分析与比较。与野生型植株(同为 3 月树龄)相比,3 个不同株系的 *PtrRHH94* 突变体植株株高均显著高于野生型植株(图 4 - a、图 4 - b)。为了探究 *PtrRHH94* 突变体植株变高的原因,统计植株茎节数,结果显示,3 月树龄野生型植株的茎节数平均约 23 节,而 3 个不同株系突变体的茎节数均达到 25 节(图 4 - c)。为了探究植株变高是否与纤维细胞变长相关,分别统计野生型、*PtrRHH94* 突变体木材 200 个纤维细胞的长度。结果显示,两者在不同长度纤维的分布与长度上均没有显著差异(图 4 - d),表明 *PtrRHH94* 突变体株变高与木质部组织细胞长度无显著相关性。

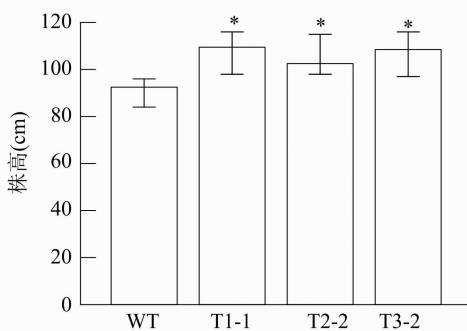
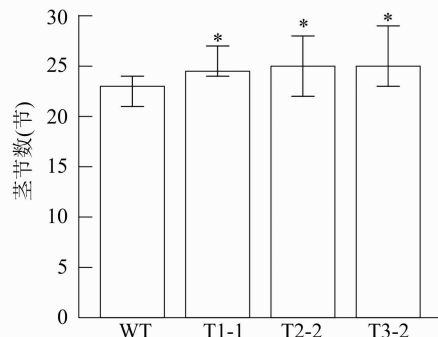
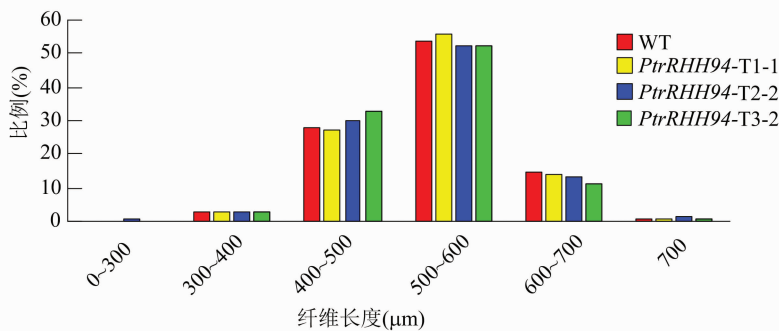
## 3 结论与讨论

RING - H2 亚家族参与了植物的多种生物学过程,然而在树木中,关于其功能的报道甚少。杨树存在多个木质部特异或高丰度表达 RING - H2 的成员<sup>[14]</sup>,这些基因很可能参与树木木材形成(林木最主要的性状)。本研究中,笔者以 *PtrRHH94* 基因为对象,基于 Cas9/gRNA 基因编辑技术创制了多株毛果杨 *PtrRHH94* 基因突变体。不同株 *PtrRHH94* 突变体展示的表型是相同的,表明靶基因被 Cas9/gRNA 高效率地产生双等位编辑突变,形成了遗传学意义的基因敲除突变体。这个结果也显示,Cas9/gRNA 基因编辑技术应用于毛果杨这个基因组最先被解读的模式树<sup>[17]</sup>是行之有效的。

*PtrRHH94* 敲除突变体出现幼树株高增加现象,表明 *PtrRHH94* 参与毛果杨茎生长。进一步探究突变体木材不同长度纤维分布及其长度与野生型的均没有显著差异,且叶片等其他器官也未发现变大,仅突变体幼树的茎节数增多。据此推测,*PtrRHH94* 参与毛果杨茎生长,很可能是通过调控茎的生长发育进程。植物 RING - H2 基因被报道具有泛素连接酶 E3 活性<sup>[5]</sup>,*PtrRHH94* 是否通过泛素化参与毛果杨茎生长发育有待被鉴定。植物泛素化途径介入的功能常常是起负调控作用<sup>[18-19]</sup>,*PtrRHH94* 敲除产生幼树变高也是负调控的特征。鉴于此,今后找出被 *PtrRHH94* 泛素化的靶蛋白,可为探明其参与毛果杨茎生长的分子作用模式提供参考。

### 参考文献:

- [1] Borden K L. RING domains: master builders of molecular scaffolds? [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 295(5): 1103 - 1112.
- [2] Li Y Z, Wu B J, Yu Y L, et al. Genome - wide analysis of the RING finger gene family in apple [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2011, 286(1): 81 - 94.
- [3] Lim S D, Yim W C, Moon J C, et al. A gene family encoding RING finger proteins in rice: their expansion, expression diversity, and co - expressed genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(4/5): 369 - 380.
- [4] Stone S L, Hauksdóttir H, Troy A, et al. Functional analysis of the RING - type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 13 - 30.
- [5] Ramadan A, Nemoto K, Seki M, et al. Wheat germ - based protein libraries for the functional characterization of the *Arabidopsis* E2 ubiquitin conjugating enzymes and the RING - type E3 ubiquitin ligase enzymes [J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 275.

a. *PtrRHH94* 突变体幼树表型b. *PtrRHH94* 突变体植株株高c. *PtrRHH94* 突变体植株茎节数WT 为野生型; 标尺为 15 cm, \*  $P < 0.05$ 图4 毛果杨 *PtrRHH94* 突变体表型分析

- [6] Lyzenga W J, Booth J K, Stone S L. The *Arabidopsis* RING - type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase 7 [J]. The Plant Journal, 2012, 71 (1): 23 - 34.
- [7] Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signaling [J]. Nature, 2007, 448 (7154): 661 - 665.
- [8] Guo H, Ecker J R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2) dependent proteolysis of EIN3 transcription factor [J]. Cell, 2003, 115 (6): 667 - 677.
- [9] Griffiths J, Murase K, Rieu I, et al. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18 (12): 3399 - 3414.

- [10] Roberts D, Pedmale U V, Morrow J, et al. Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3 - Ring E3 ubiquitin ligase CRL3 (NPH3) [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (10): 3627 - 3640.
- [11] Cheng M C, Hsieh E J, Chen J H, et al. *Arabidopsis* RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response [J]. Plant Physiology, 2012, 158 (1): 363 - 375.
- [12] Cho S K, Ryu M Y, Seo D H, et al. The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid - mediated drought stress responses [J]. Plant Physiology, 2011, 157 (4): 2240 - 2257.
- [13] Gao T, Wu Y R, Zhang Y Y, et al. OsSDIR1 overexpression greatly

柳军,王学林,张玉龙,等. 播期对江淮一季稻生长发育及产量形成的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):49-55.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.008

# 播期对江淮一季稻生长发育及产量形成的影响

柳军<sup>1</sup>,王学林<sup>1</sup>,张玉龙<sup>1</sup>,邓斌<sup>1</sup>,王志<sup>1</sup>,曾凯<sup>2</sup>

(1.安徽省合肥市气象局,安徽合肥 230000;2.江西省农业气象试验站,江西南昌 330200)

**摘要:**合理确定水稻最佳播期是实现水稻高产的重要环节。以江淮一季稻主栽品种辐优17为试材,于2018年3—9月在安徽省合肥市农业气象试验站设计水稻大田分期播种试验,系统分析播期对水稻生长发育、灌浆特性及产量构成等方面的影响。研究表明:(1)播期越早,水稻营养生长阶段和全生育期越长;不同播期下水稻植株生长高度变化趋势基本一致,增长速率以4月16日播期最大,水稻叶面积指数在3月27日和4月16日播期明显优于其他播期,更有利于提高水稻光合生产能力。(2)各播期水稻群体植株地上部分干物质积累过程均略呈拉长的“S”形曲线,4月16日播期的干物质积累最大增长速率出现时间最早,3月27日、4月6日播期次之,4月26日最晚。(3)各播期水稻千粒质量积累过程呈“慢—快—慢”的“S”形曲线,水稻籽粒灌浆速度均为明显的单峰变化曲线,但各播期水稻灌浆特征参数差异较大。总体来说,播期越迟,灌浆持续时间越短,越有利于水稻粒质量积累。(4)播期改变对水稻产量构成影响较大,适当早播(4月16日)可增加水稻穗结实粒数、降低空壳率和秕谷粒,从而提高水稻产量。本研究结果可为江淮一季稻高产栽培提供一定的科学依据。

**关键词:**江淮地区;一季稻;最佳播期;生长发育;产量形成;Logistic方程

**中图分类号:**S511.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)22-0049-07

水稻(*Oryza sativa* L.)属于禾本科稻亚科稻属,是世界上三大主要粮食作物之一,广泛种植于热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>。安徽省水稻种植区主要分布在沿江、江淮和沿淮等地,水稻生产以单季中稻为主<sup>[2-3]</sup>。近年来,随着全球气候的持续变暖,单季稻

原有的熟制、布局和结构均相应发生了较大调整,如继续按以往确定的水稻最佳适播期播种,很难充分利用气候资源。因此,系统开展气候变化背景下水稻适播期试验,确保水稻的丰产丰收与高产高效,已成为人们最为关心的问题。

前人关于播期对水稻生长特性及产量形成等方面的影响已有不少研究,但由于各地区栽培生态条件和品种特性等因素不同,研究结果也不尽相同。已有研究发现,播期会影响水稻生育期时间长短<sup>[4]</sup>、灌浆速率<sup>[5]</sup>、稻米品质<sup>[6]</sup>、光合势<sup>[7]</sup>、产量构成<sup>[8-13]</sup>等。霍中洋等研究发现,随着播期的推迟,水稻干物质积累量及叶、茎的输出量、输出率和输

收稿日期:2020-06-19

基金项目:江淮水稻安全齐穗指标修订与种植结构适应性分析(编号:KM202005);南昌市农业气象重点实验室开放基金(编号:2019NNZS202);合肥市气象局科研项目(编号:HFZL20190X)。

作者简介:柳军(1972—),男,高级工程师,主要从事农业气象防灾减灾研究。E-mail:simliou@sohu.com。

通信作者:王学林,硕士,工程师,主要从事农业气象灾害研究。

E-mail:912856253@qq.com。

improves drought tolerance in transgenic rice[J]. *Plant Molecular Biology*,2011,76(1/2):145-156.

[14] Tong G M, Shen H M, Cao S Q, et al. Identification of RING-H2 gene candidates related to wood formation in poplar[J]. *Forests*, 2019,10(8):698.

[15] Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[J]. *BMC Plant Biology*,2014,14(1):327.

[16] Li S J, Zhen C, Xu W J, et al. Simple, rapid and efficient transformation of genotype Nisqually-1: a basic tool for the first sequenced model tree[J]. *Scientific Reports*,2017,7(1):2638.

[17] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006,313(5793):1596-1604.

[18] Feng Q, Yoh S, Tran L S, et al. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2008,20(6):1693-1707.

[19] Liu L F, Jin L, Huang X H, et al. OsRFP2-10, a ring-H2 finger E3 ubiquitin ligase, is involved in rice antiviral defense in the early stages of rice dwarf virus infection [J]. *Molecular Plant*,2014,7(6):1057-1060.