

周益军, 李 硕, 程兆榜, 等. 中国水稻条纹叶枯病研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1007-1015.

中国水稻条纹叶枯病研究进展

周益军, 李 硕, 程兆榜, 周 彤, 范永坚

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 水稻条纹叶枯病是水稻重要的病毒病害, 对水稻生产造成了极大损失。该病是由灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallén)传播水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)引起的。该文综述了近年来国内外有关水稻条纹病毒的基因组结构、功能、复制、表达调控、分子变异、病毒与介体互作、抗病育种、预测预报和防治等方面的最新研究进展, 并进行了讨论和展望。

关键词: 水稻条纹病毒; 基因组结构和功能; 互作

中图分类号: S435.111.4⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2012)05-1007-09

Research advances in rice stripe disease in China

ZHOU Yi-jun, LI Shuo, CHENG Zhao-bang, ZHOU Tong, FAN Yong-jian

(*Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: Rice stripe disease is a significant virus disease in rice plants, which was reported to have caused severe yield losses in recent years. The pathogen, rice stripe virus (RSV), is known to be transmitted mainly by the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén, SBPH). In this paper, the genome organization, function, replication, gene expression and regulation, molecular variability, interactions between virus and vector, resistance breeding of RSV, as well as forecast and control of the disease were reviewed. Meanwhile, researches on RSV was prospected.

Key words: rice stripe virus; genome organization and function; interaction

水稻条纹叶枯病是水稻重要病害之一, 主要发生在东亚的温带、亚热带地区, 近年来, 该病在中国广大稻区暴发流行, 给水稻生产造成了严重损失。该病是由灰飞虱 [*Laodelphax striatellus* Fallén (small brown planthopper, SBPH)] 传播水稻条纹病毒 (Rice stripe virus, RSV) 引起的^[1], 因危害性严重被称为是水稻上的“癌症”。近年来随着分子生物学的发展, 人们对 RSV 基因组结构、功能、复制、表达调控、分子变异、病毒与介体互作机制、抗病育种、预

测预报以及防治策略都开展了较为全面的研究。本文对这些方面的研究进展, 尤其是对江苏省农业科学院植物保护研究所在这些方面的研究工作进行了综述, 供交流讨论、借鉴和参考。

1 水稻条纹叶枯病的分布和发生概况

水稻条纹叶枯病最早于 1897 年在日本关东地区发生, 后来在朝鲜、韩国、前苏联和乌克兰也有发现^[1]。在中国, 该病自 1963 年在江苏南部地区始发后^[2], 70 年代在北京郊区发生较重, 80 年代在山东东南部和云南地区曾数度流行, 90 年代在全国粳稻种植区普遍流行, 造成水稻产量的严重损失。在江苏省, 1998 年开始在部分稻区流行; 2001 年在大部分稻区, 如盐城、淮安、泰州、扬州、连云港、苏州等地暴发流行且不断蔓延; 2002 年发生面积扩大至 1.00×

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170142); 国家公益性行业(农业)科研专项(201003031); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(10)207]; 江苏省自然科学基金项目(BK2010018)

作者简介: 周益军(1957-), 男, 江苏涟水人, 博士, 研究员, 主要从事植物病毒与水稻病害研究。(E-mail) yjzhou@jaas.ac.cn

10^6 hm^2 , 病株率 5% ~ 25%, 重病田病株率达 50%^[3]; 2004 年发病面积达 $1.57 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 占江苏水稻种植面积的 79%, 成片水稻绝收; 2005 年发病面积达到 $1.87 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 并开始向浙江、安徽、河南、山东、上海等周边省市蔓延, 引起了很大的社会反响^[4]。在江苏建湖等地, 还同时出现了水稻条纹病毒危害小麦的情况^[5]。2005 年以后, 江苏省通过推广防控技术和种植抗病品种, 水稻条纹叶枯病的危害逐渐回落。目前该病已扩散到全国 18 个省(市、自治区)的广大稻区, 其中以江苏、浙江、山东、河南、云南等地粳稻田发病更为普遍。

2 水稻条纹病毒的分子生物学研究

2.1 生物学特性

水稻条纹叶枯病的病原物曾被认为是直径 30 ~ 50 nm 的球状病毒, 直到 1975 年才报道 RSV 病毒粒子为直径 3 ~ 8 nm、长度不等的无包膜丝状体^[6]。灰飞虱是 RSV 最主要的传播介体, 灰飞虱获毒后以持久方式经卵传播, 病毒能在虫体内循环并增殖。

RSV 有两种不同类型的寄主, 既能侵染禾本科植物, 又能在昆虫体内复制和增殖, 因此, 认为它既是一种植物病毒, 又是一种昆虫病毒^[7]。在植物寄主中, RSV 在自然条件下只侵染禾本科植物, 但与本属其他成员相比, 寄主范围相对广泛。除水稻外, RSV 还可侵染大麦、小麦、玉米、燕麦、小黑麦、稗草、早熟禾、看麦娘等 80 多种禾本科植物^[8], 但其中只有水稻和过冬的杂草是 RSV 的最适寄主, 可作为下一个作物生长季的病毒源。实验室条件下, RSV 可以通过摩擦接种侵染本氏烟^[9], 也可通过灰飞虱传毒侵染拟南芥^[10]。

2.2 RSV 的进化地位

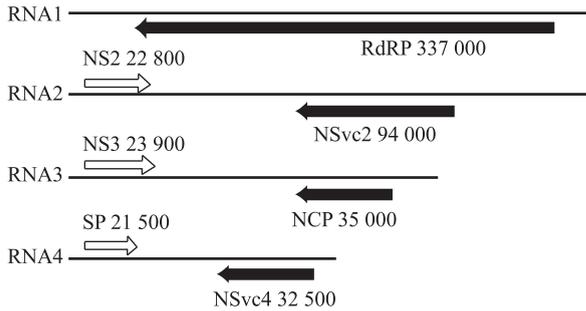
国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)第八次会议将 RSV 划分入纤细病毒属(*Tenuivirus*), 并成为该属的典型成员。纤细病毒属成员和布尼亚病毒科(Bunyaviridae)的番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)、白蛉热病毒属(*Phlebovirus*)各成员基因组在核酸末端保守序列、复制酶、开放阅读框(ORF)、基因间隔区、双义编码策略等方面有一定的相似性, 它们之间在进化上存在着一定的亲缘关系。在生物学特性方面, 这些病毒也具有一定的相似性。纤细病毒属与布尼亚病毒科的病毒都由昆虫介体传播, 且都能在两种不同类

型的细胞中繁殖。白蛉热病毒属病毒可在脊椎动物和无脊椎动物的细胞中繁殖, 而番茄斑萎病毒属和纤细病毒属病毒可在无脊椎动物细胞和植物细胞中繁殖^[11]。但在粒体形态和基因组组成方面, 各病毒之间有较大差异。粒体形态方面, 纤细病毒属病毒为多型性的丝状粒体, 而白蛉热病毒属和番茄斑萎病毒属病毒均为具外膜的球形粒体; 基因组组成方面, 纤细病毒属为 4 ~ 6 个 RNA 区段, 而白蛉热病毒属和番茄斑萎病毒属病毒均为 3 个^[12]。Van Poelwijk 等^[11]提出, 纤细病毒属和番茄斑萎病毒属病毒起源于共同的祖先, 即可以感染昆虫的布尼亚病毒科, 但这两个属沿着两条不同的途径各自进化。纤细病毒属和番茄斑萎病毒属的生存处于两个完全不同的生态位, 前者是飞虱/单子叶植物, 后者是蓟马/双子叶植物, 这是昆虫在病毒进化中扮演关键角色的一个典型的例子。

2.3 RSV 的基因组结构及编码蛋白的功能

RSV 是负义单链 RNA(-ssRNA)病毒, 其基因组按分子量递减的顺序分别命名为 RNA1、RNA2、RNA3 和 RNA4。Takahashi 等^[13]对 RSV 日本 T 分离物的 4 条单链 RNA 的 5' 及 3' 末端进行了测序, 结果发现每种单链 RNA 的 5' 端及 3' 末端各有约 20 个核苷酸互补(只有 RNA1 的 3' 末端的第 6 位核苷酸不能配对), 形成锅柄状的分子内二级结构, 这种独特的二级结构可能是依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRP)的识别位点。RSV 具有独特的编码策略, 除 RNA1 采用负义编码策略外, RNA2、RNA3、RNA4 均采用双义编码策略, 即在 RNA 的病毒义链(vRNA)和病毒互补义链(vcRNA)上各有一个大的 ORF, 都可以编码蛋白质(图 1)^[14]。其结构为: 5' 端非编码区(UTR)-5' 端编码区-基因间隔区(IR)-3' 端编码区-3' 端 UTR。

2.3.1 RdRP 纯化的 RSV 粒体中含有两种病毒蛋白, 除 35 000 大小的核衣壳蛋白外, 还有一个分子量为 230 000 的蛋白, 推测其为 RNA1 编码的复制酶 RdRp^[15]。Toriyama 等^[16]克隆了 RNA1 全序列, 在 vcRNA1 序列中有一个长的 ORF, 推测其编码一个 337 000 的具有 RdRp 结构特征的复制酶。RdRp 理论大小与电泳检测到的复制酶的分子量(230 000)相差较大, 这种差异在番茄斑萎病毒属病毒的 RNA 聚合酶中也有报道^[17], 这暗示在不同的寄主体系中, 复制酶可能经历了不同的翻译后修饰。



白色箭头表示 RNA 病毒义链上的开放阅读框 (ORF), 深色箭头表示病毒互补义链上的 ORF, 箭头方向指示 ORF 的翻译方向。

图 1 RSV 基因组结构图

Fig. 1 Genome organization of rice stripe virus

2.3.2 NS2 和 NSvc2 Takahashi 等^[18]测定了 RSV T 分离物的 RNA2 全序列, 在 vRNA2 5' 端区域有一个 ORF, 编码 22 800 的 NS2 蛋白, 在 vcRNA2 5' 端区域含另一个长的 ORF, 编码一个 94 000 的蛋白 NSvc2。

Takahashi 等^[19]发现, 在 RSV 侵染的灰飞虱单层细胞培养体系中, NS2 蛋白可诱导形成胞间连丝状的管状结构, 结合其瞬时表达等特征, 推测它与病毒的胞间运动有关。Du 等^[20]筛选水稻文库发现 NS2 蛋白可与水稻的基因沉默抑制子 3 (SGS3) 互作, 并证明了 NS2 是 RSV 编码的一个沉默抑制子。

根据纤细病毒属 *vcRNA2* 编码的 NSvc2 蛋白与白蛉热病毒属相应蛋白之间氨基酸序列的相似性, 推断该蛋白为膜糖蛋白^[12]。Liang 等^[21]在灰飞虱唾液腺和中肠上皮细胞中定位到 NSvc2 蛋白的存在, 并且可以与病害特异性蛋白 (Disease-specific protein, SP) 在带毒昆虫中肠共积累, 形成纤维质状的电子不透明 (FEO) 内含体, 暗示 NSvc2 蛋白和 SP 都可能在病毒与昆虫介体的识别过程中起作用。Li 等^[22]对 NSvc2 蛋白的结构进行了预测, 发现 NSvc2 基因产物在水稻和灰飞虱体内以 2 种不同的形式存在, 在水稻中存在切割现象, 而在灰飞虱体内以大小为 94 000 的完整蛋白质存在。Zhao 等^[23]报道 NSvc2 在水稻和昆虫 SF9 细胞中均存在切割现象, 这种差异的原因可能是 SF9 细胞并不是 RSV 的真实寄主细胞 (RSV 不能侵染 sf9 细胞)。

2.3.3 NS3 和 NCP Zhu 等^[24]克隆了 RSV T 分离物的 RNA3 组分, 在 vRNA3 5' 端区域的 ORF 编码 NS3 蛋白 (大小 23 900), 在 vcRNA3 5' 端区域的 ORF 编码大小为 35 000 的病毒核衣壳蛋白 (Nucleo-

capsid protein, NCP)。

曲志才等^[25]在病叶和带毒虫体内检测到 NS3 蛋白。Xiong 等^[26]证实 RSV NS3 蛋白是基因沉默的抑制子, 它能与单链和双链 siRNA 结合, 说明 NS3 是通过与寄主蛋白竞争结合 siRNA 而阻止沉默复合体 (RISC) 的形成, 起沉默抑制作用的。有研究表明, 植物病毒致病性决定因子往往就是转录后基因沉默的抑制因子, 研究发现 NS3 可以增强马铃薯 X 病毒 (PVX) 在本氏烟中的致病性, 但将其基因转化入本氏烟、普通烟和水稻植株后, 并没有发现转基因植株生长发育出现任何异常, 说明 RSV NS3 不是致病性决定因子^[26]。

刘利华等^[27]电镜观察发现 NCP 和 SP 在病叶的叶绿体和细胞质中都有存在。明艳林等^[28]发现 NCP、SP 均可进入感病水稻的叶绿体内, 其浓度与病症的严重程度成正相关。由于 RSV 粒子是无包膜的线性粒体, 粒子最外层由 NCP 蛋白包裹组成, 因此普遍认为 NCP 在参与介体识别和传播过程中起重要作用。

2.3.4 SP 和 NSvc4 Zhu 等^[29]对 RSV 的 RNA4 组分进行了全序列测定, 同样含有 2 个 ORF。1 个 ORF 位于 vRNA4 的 5' 端区域, 编码感病水稻中大量存在的非结构蛋白^[11], 即病害特异性蛋白 SP (大小 21 500)。另一个 ORF 位于 vcRNA4 的 5' 端区域, 编码蛋白 NSvc4 (大小 32 500)。

林奇田等^[30]发现 NCP 和 SP 蛋白在病叶中的积累量与褪绿花叶症状的严重程度密切相关, 推测这两种蛋白都是致病相关蛋白。Zhou 等^[31]基于 RNAi 原理, 以感病品种作为受体制备了可同时沉默 NCP 和 SP 基因的转基因水稻, 该株系对 RSV 的侵染表现为高抗, 这也暗示 NCP 和 SP 可能都是病毒的致病相关蛋白。

曲志才等^[25]在水稻病叶和带毒虫体内均检测到了 NSvc4 蛋白。刘利华等^[27]发现病叶叶肉组织细胞壁的胞间连丝中存在 NCP, 这暗示 NCP 极有可能协同 RSV 的运动。Xiong 等^[17]发现 NSvc4 蛋白能够互补运动缺陷型 PVX 的运动功能, 并且主要定位于发病水稻叶片的细胞壁上, 证明其为 RSV 编码的运动蛋白, 但 NSvc4 与 NCP 在酵母双杂交系统中不能互作, 这暗示 NCP 可能不是病毒运动所必需的。然而张开玉等^[32]发现表达的 NSvc4 蛋白可以与 RSV 粒子在体外结合, 综合之前 NCP 在细胞壁

胞间连丝中积累的报道,推测 RSV 在胞间运动仍然需要 NCP 的参与,结果不同可能是由不同的互作试验体系造成的。Zhang 等^[33]分析了 NSvc4 氨基酸序列中运动功能所必需的区域,并发现 NSvc4 可以

导致本氏烟叶片坏死。

综上所述,RSV 基因组的结构和功能可归纳为表 1。

表 1 水稻条纹病毒基因组结构和功能

Table 1 Genome organizations and protein functions of RSV

区段	核苷酸数	编码链	编码蛋白质	分子量	蛋白质功能	参考文献
RNA1	8 970	vcRNA1	RdRP	337 000	复制酶	Toriyama ^[14] ; Toriyama 等 ^[15]
RNA2	3 514	vRNA2	NS2	22 800	沉默抑制子;参与运动(?)	Du 等 ^[20] ; Takahashi 等 ^[19]
		vcRNA2	NSvc2	94 000	膜糖蛋白(?);参与介体传播(?)	Ramirez 等 ^[12] ; Liang 等 ^[21]
RNA3	2 504	vRNA3	NS3	23 900	沉默抑制子	Xiong 等 ^[26]
		vcRNA3	NCP	35 000	核衣壳蛋白;致病相关蛋白(?)	Toriyama ^[14] ; 林奇田等 ^[30]
RNA4	2 157	vRNA4	SP	21 500	病害特异性蛋白;致病相关蛋白(?);参与介体传播(?)	林奇田等 ^[30] ; Liang 等 ^[21]
		vcRNA4	NSvc4	32 500	运动蛋白	Xiong 等 ^[17] ; Zhang 等 ^[33]

2.4 病毒基因组的复制、转录与表达调控

目前,有关 RSV 复制、转录和表达策略方面的研究还不是很深入。已有研究表明,RSV 基因组的某些结构可能在病毒的复制、转录和表达调控中起作用。RSV 独特的柄状二级结构可能是聚合酶 RdRP 的识别位点。Barbier 等^[34]发现只有 RNA 3'末端的保守序列为聚合酶 RdRP 的识别位点充当了启动子的作用,5'末端的保守序列才可能在病毒 RNA 的复制中起作用。RNA3 和 RNA4 的 2 个 ORF 之间的 IR 能折叠成发夹结构,可能起转录终止信号的作用^[24,29]。RSV 基因组 RNA 的 5'端没有帽子结构,Shimizu 等^[35]从 RSV 感染的小麦中分离病毒 mRNA,发现其 5'末端都有 10~23 个非病毒来源的核苷酸,序列分析结果显示这些核苷酸来自寄主细胞的 mRNA,这暗示 RSV 的转录采取了“加帽”机制。Yao 等^[9]也证明 RSV 通过“抢帽子”起始自身 mRNA 的合成,长度 12~16 nt 的“帽子”引物最适合起始和延伸。由于 RSV 基因组的双义编码特性,从 vRNA 直接翻译蛋白质,如 SP,是病毒复制循环早期阶段的产物,而由 vcRNA 编码的蛋白质,如 CP,只能在 vcRNA 合成后才能表达,因此出现在病毒复制循环的后期^[30,36]。Li 等^[37]利用实时定量 PCR 技术分析了 RSV 全部 7 个基因在感病水稻和带毒灰飞虱体内的表达丰度。结果显示,NS3 基因在水稻和灰飞虱体内均为最高表达水平,NS3 的高丰度表达说明 RSV 侵入寄主细胞后,必须首先抑制

寄主的免疫系统,以保证自身的复制,但同样作为沉默抑制子的 NS2 在两类寄主内的表达量都不高,NS2 和 NS3 如何协调沉默抑制功能值得进一步研究;SP 基因仅在水稻中高丰度表达,在灰飞虱体内表达量相对偏低;其他基因在两类寄主中的表达水平低于 SP 基因,且彼此接近;与复制酶 RdRP 基因在灰飞虱体内的极低表达量(NCP 基因的 0.2 倍)相比,RdRP 基因在水稻中的表达量相对较高(是 NCP 基因的 0.8 倍),这暗示 RSV 在水稻中的复制可能要比在灰飞虱体内更加强烈。曲志才等^[25]应用 Western-blot 分析带毒虫体内 NCP 和 SP 蛋白的积累量,发现 NCP 在灰飞虱体内大量表达,而 SP 的表达量很低,暗示 SP 在昆虫介体内功能可能较小,这也许是 SP 基因在进化过程中有相对较大变异的原因的一种解释。

2.5 RSV 致病性分化和分子变异

研究结果表明,不同地区 RSV 分离物的致病力有所差异。林含新等^[38]对中国辽宁、北京、山东、上海、福建、云南等地的 7 个 RSV 分离物在 6 个籼稻和粳稻鉴别品种上的发病率和症状严重度进行了评价,结果表明,这 7 个分离物存在致病力差异,但血清学反应结果相同。程兆榜等^[39]将来自云南大理、保山,河北唐海,山东济宁,江苏高邮、洪泽、丹阳、盐都、海安、沛县等地的 22 个 RSV 分离物在 36 个粳稻品种上进行致病力评价,按照致病力强弱划分为 5 个致病型,发现 RSV 不同致病型呈随机分布状态,

证明 RSV 自然种群是混合致病群。

不同 RSV 分离物的 *RNA2*、*RNA3* 和 *RNA4* 的序列分析表明,RSV 的编码区序列和 5'端及 3'端的非编码区序列相对保守,而 IR 区域的变异较大^[40]。研究发现 RSV 不同分离物 IR4 区段内形成的发夹结构存在明显差别,IR4 的分子变异与致病性密切相关,IR4 内发夹结构越稳定,RSV 分离物的致病性相对越弱,推测 IR4 内形成的发夹结构极有可能在 *SP* 基因的转录调控中发挥重要作用^[41]。

3 水稻条纹病毒与介体灰飞虱的互作

3.1 灰飞虱的传毒特性

灰飞虱主要传播两种病毒,即 RSV 和水稻黑条矮缩病毒(Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)。灰飞虱获得 RSV 与获得 RBSDV 的能力不同,与 RBSDV 相比,灰飞虱从病株上获取 RSV 的能力相对较低^[42]。在自然情况下,灰飞虱一旦获毒即可终身带毒和传毒。灰飞虱最短 3 min 就可将 RSV 传到水稻植株上,一般传毒时间为 10 ~ 30 min。灰飞虱的雌雄个体成虫及若虫均可传毒,3 ~ 5 龄灰飞虱若虫传毒力较强,成虫传毒力有所下降,雌虫传毒能力强于雄虫^[43]。带毒灰飞虱随着虫龄的提高,携带的 RSV 含量亦快速提高^[44]。RSV 经卵传毒率很高,日本一些灰飞虱品系卵传率可达 96% ~ 100%^[45]。

3.2 灰飞虱与 RSV 的亲性和互作

不同来源的灰飞虱与 RSV 的亲合力存在差异,这种差异是可遗传的,通过杂交选育可以改变群体中活跃传毒虫和非活跃传毒虫的比例,从而获得高亲和力和低亲和力的家系^[4]。刘海建等^[46]对灰飞虱江苏种群与 RSV 的亲性和互作关系进行研究后,将其划分为 4 种类型:高亲和性灰飞虱、中亲和性灰飞虱、低亲和性灰飞虱和非亲和性灰飞虱。高亲和性灰飞虱群体可以稳定地经卵传播 RSV;中亲和性灰飞虱群体可以在一段时间内稳定地经卵传播 RSV,随着世代的延长其携带 RSV 的能力下降较快,重新纯化后短期内可以完全恢复携毒能力;低亲和性灰飞虱群体可以获得 RSV,但不能稳定地经卵传播 RSV;非亲和性灰飞虱群体不能获得和携带 RSV。

3.3 灰飞虱带毒对后代生活力的影响

有关 RSV 对灰飞虱生活力的影响方面,李小力^[47]将亲代灰飞虱组成 4 个组合(带毒♀×带毒♂、

带毒♀×无毒♂、无毒♀×带毒♂、无毒♀×无毒♂)交配产卵,观察亲代灰飞虱带毒对 F_1 代产卵量、孵化历期、孵化率、成活率和带毒率等 5 个方面的影响。结果显示灰飞虱后代的带毒情况只取决于亲代雌虫是否带毒,与其亲代雄虫是否带毒几乎无关联;灰飞虱亲代带毒,可使 F_1 代孵化历期延长,对 F_1 代的产卵量、成活率无明显影响,但对 F_1 代的孵化率影响很大,若亲代雄虫带毒,其 F_1 代孵化率明显下降。

3.4 灰飞虱体内 RSV 互作蛋白的筛选

寻找灰飞虱体内的 RSV 互作蛋白,对于研究灰飞虱传毒的分子机制至关重要。Li 等^[48]采用双向电泳(2-DE)和病毒覆盖测定从高亲和性无毒灰飞虱总蛋白质中筛选出 5 个能与 RSV 粒子特异性结合的蛋白质因子,并鉴定为有活性的激酶 C 受体(RACK)、60S 核糖体蛋白 L5(RPL5)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH3*)、60S RPL7a 和 60S RPL8。在克隆 5 个蛋白质的全长基因后,对 5 个互作蛋白质的病毒结合能力进行了验证,结果显示 RACK 和 *GAPDH3*(已证实为蚜虫的传毒生物标记)与病毒的互作可能依赖于蛋白质在膜系统中的特殊构象,推测其参与病毒的跨细胞作用,3 个核糖体蛋白(RpL5、RpL7a 和 RpL8)可能参与 RSV 在灰飞虱体内的增殖。李硕等^[49]以灰飞虱高带毒群体为材料,采用同源重组技术构建了酵母双杂交 cDNA 文库,经筛选文库,获得了一系列 RSV-NCP 互作蛋白^[50]。这些结果为深入研究 RSV 与灰飞虱的互作奠定了基础。

3.5 RSV 在灰飞虱体内的分布及卵传机制

研究结果发现,灰飞虱的唾液腺、中肠上皮细胞、脂肪体以及卵巢滤泡细胞均有 RSV 粒子的分布^[51],李硕^[50]筛选灰飞虱体内的病毒互作蛋白,发现 RSV NCP 可以与灰飞虱的神经蛋白结合,鉴于一些循环增殖型植物病毒可以感染介体昆虫的神经系统^[52],这一结果暗示 RSV 很可能感染灰飞虱的神经系统。邓金花^[53]利用免疫胶体金技术对 RSV 卵传机制进行研究,观察到灰飞虱卵巢的滤泡细胞、卵壳以及卵内部均有病毒的分布,由于卵壳上的卵壳蛋白主要是由滤泡细胞分泌,这说明病毒粒子在滤泡细胞中向正在发育的卵母细胞提供营养时,可以随着营养物质进入卵内。Zhang 等^[54]测定了灰飞虱群体的转录组,发现带毒灰飞虱群体中卵黄原蛋白的转录本水平在所有转录本中是最高的,并且远高

于无毒群体中的转录水平,此外还发现卵黄原蛋白可以与 RSV NCP 互作^[50],这些结果都暗示 RSV 很可能是随着卵黄原蛋白运输途径进入卵母细胞。

3.6 灰飞虱体内寄生微生物对传毒的影响

在病毒与昆虫介体复杂的互作关系中,昆虫体内寄(共)生微生物对介体传毒也起着重要影响。目前还没有灰飞虱体内寄(共)生微生物影响 RSV 传播的明确报道。GroEL 是蚜虫体内由内共生菌 *Buchnera aphidicola* 产生的分子伴侣,属于病毒结合蛋白,对病毒粒子在介体血淋巴中的稳定起着重要的保护作用^[55]。目前灰飞虱体内的 *Buchnera GroEL* 基因仍未被克隆,也未发现 GroEL 与 RSV 粒子之间的互作^[48],因此灰飞虱体内的 GroEL 是否影响 RSV 的传播仍需进一步研究。Zhang 等^[54]通过转录组测序发现灰飞虱体内存在大量的共生菌沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*),并且无毒虫携带量是带毒虫的 4 倍,暗示它可能与 RSV 的侵染有一定的相关性。然而乐文静等^[56]报道,虽然沃尔巴克氏体在灰飞虱体内广泛存在,但是灰飞虱体内沃尔巴克氏体的感染与其携带 RSV 无明显的相关性,同时二者在经卵传播过程中也没有明显相关性。长期以来,灰飞虱群体对 RSV 亲和性的差异被认为是由灰飞虱基因型差异造成的,但并没有直接证据。最近研究结果发现昆虫病毒(HiPV)在灰飞虱高亲和群体内广泛存在,HiPV 外壳蛋白 VP1 可以与 RSV NCP 发生互作,并且灰飞虱体内 HiPV 的感染与其携带 RSV 有一定的相关性,于是提出了一个假说,即灰飞虱高亲和性群体对 RSV 具有高亲和性的主要原因,是灰飞虱体内感染了昆虫病毒 HiPV^[50]。当然,该假说有待进一步验证,这也是未来研究 RSV 与灰飞虱互作关系的一个重要方向。

4 水稻条纹叶枯病抗性遗传和育种研究进展

水稻条纹叶枯病是由传毒媒介灰飞虱传播的病毒病,水稻对该病的抗性主要表现在抗病性和抗虫性两个方面。抗病性即对 RSV 的抗性,可细分为抗病毒侵染和病毒侵染后的忍耐性两种;而抗虫性即对传毒介体灰飞虱的抗性。水稻条纹叶枯病的防治实践结果表明,对该病最经济有效和环保的防治方法是种植抗病品种。由于抗性基因来源的单一性,使得抗性资源的发掘和抗性品种的选育成为必要,

获得的优质抗源结合分子标记进行辅助选择,有望加快抗性品种选育的速度。一系列抗性鉴定试验结果发现中国地方品种中蕴藏着丰富的抗性资源,籼稻品种抗源更丰富^[57]。江苏省农业科学院植物保护研究所确定了水稻品种抗条纹叶枯病鉴定技术规范^[58],并鉴定出主栽抗病粳稻品种镇稻 88^[59-60],系统分析了其抗性特征和遗传基础^[61],利用该抗性资源,育种家迅速育出徐稻 3 号、徐稻 4 号、连粳 4 号等一批抗病品种,在生产上大面积推广,取得了良好的生产效益。由于常规育种周期长、效率低,利用转基因技术和 miRNA 转基因抗病毒技术改良现有的品质优良的感病品种是一个快捷有效的途径,目前已经获得了一些转基因抗病水稻^[31,62],但距离推广应用尚有一段距离。此外,有关水稻对灰飞虱的抗性遗传研究较少,生产上缺乏具抗虫性的主栽品种。

5 水稻条纹叶枯病的预测预报及控制策略

灰飞虱-RSV-水稻-环境构成了水稻条纹叶枯病流行的生态系统,因此,灰飞虱、带毒率、水稻品种与栽培方式等预测因子是进行病害预测预报的重要依据。在田间通过普查和系统调查各预测因子相结合的方法可以对水稻条纹叶枯病进行预测预报。为了提高预测预报的时效性和准确率,可以在掌握发病规律的基础上进行关键预报因子的筛选,灰飞虱种群带毒率是预测条纹叶枯病流行程度的关键因子。为了建立灰飞虱带毒率的快速检测方法,王贵珍等^[63]制备了 RSV 单克隆抗体,并基于 DIBA 方法创制了非实验室条件下灰飞虱带毒率检测技术^[64],满足基层农技人员检测需求,目前,该技术在华东稻区广泛应用^[65]。基于灰飞虱带毒率等预测因子,作者带领团队组建预测模型,制定了水稻条纹叶枯病测报技术规范^[66],对指导条纹叶枯病的防治发挥了重要作用。

近年来,随着防控技术的推广和抗病品种的种植,水稻条纹叶枯病的危害逐渐回落,病害损失得到了有效控制,但是水稻条纹叶枯病仍在持续流行,究其原因主要与灰飞虱的再猖獗和条纹病毒的有效积累有关。水稻条纹叶枯病的防治应坚持“预防为主,综合防治”的植保方针,把握周年侵染循环的薄弱环节,遵循“抗、避、断、治”综合防治策略,实现病害的可持续控制,具体地讲,应以种植抗(耐)病品

种为基础,以科学防治灰飞虱为关键,辅以调整播栽期避病和覆盖防虫网(无纺布)阻断灰飞虱传毒等,具体应用时可根据当地的生态特点和特定的防治田块类型进行组合集成,采取以其中1~2项为主其余为辅的策略^[67]。(1)抗病品种,品种抗性是防治水稻条纹叶枯病最为重要的措施,在江苏等地病害的防控中发挥了重要作用。田间试验和示范结果表明,种植抗条纹叶枯病品种时无需防治灰飞虱,水稻条纹叶枯病的发生率一般低于3%,对产量几乎没有影响。(2)治虫防病,这是水稻条纹叶枯病防治的重要应急手段,江苏突发水稻条纹叶枯病之时该措施在病害防控中发挥了巨大作用,至今仍是条纹叶枯病防治的重要手段。除秧田防治外,水稻移栽后大田初期对二代若虫的防治同样重要甚至更为重要。(3)栽培控病,该措施的有效性尚未被充分认识。田间普查和小区试验示范结果表明,早育秧、机插秧、抛秧等栽培方式和适期迟播迟栽可有效控制条纹叶枯病的发生,防效在80%以上^[4]。(4)集成应用,单项技术难以完全有效地控制水稻条纹叶枯病,实践证明综合防控是水稻条纹叶枯病防治的根本出路。综合防控注重技术的集成应用,经初步试验示范,采用秧田防虫网或无纺布全程覆盖+机插秧+适期迟播+适期移栽是一个可行的选择。该集成技术突破了品种的限制,不使用化学农药,并且针对阻断灰飞虱的传毒而设计,可以实现对灰飞虱传播的条纹叶枯病和黑条矮缩病2种水稻病毒病害的双控。

6 展望

近年来,有关RSV的研究取得了上述进展,使我们对RSV的基因组结构、功能、复制、表达调控、病毒与介体互作机制有了一定程度的认识,对条纹叶枯病的有效防治也积累了丰富的经验和策略。但仍有一系列的问题困扰着研究者,RSV的致病机制、基因表达调节机制、病毒与昆虫介体的互作、病毒的起源及病毒与寄主的共同演化等方面都有待深层次研究。

NS2虽然具有沉默抑制子活性,但它在植物和昆虫体内的表达量都不高,在RSV侵染循环中是否发挥沉默抑制子的作用,NS3和NS2如何协调基因沉默功能都需要进一步分析。RSV如何被介体灰飞虱识别并被传播,这也是人们关心的问题。现已

证实NSvc2蛋白在水稻中以切割状态存在,而NSvc2对于RSV在水稻中的侵染和致病性几乎没有影响^[68],这是否暗示NSvc2切割的意义就是为了介导病毒与灰飞虱中肠受体结合实现介体的获毒,这将是未来研究的重点。由于RSV基因组为多分体负义RNA,且基因组大而复杂,难以构建全长侵染性cDNA克隆,并且RSV不能经摩擦接种侵染水稻,其接种仍需依赖于灰飞虱,这致使许多反向遗传学等分子生物学手段难以在系统研究RSV基因功能中发挥应有的作用。尽管难度大,但RSV的侵染性克隆正在被一些研究者构建,如能突破这一瓶颈,将会大大加快RSV的基因功能研究。Sun等^[10]发现RSV可通过灰飞虱传毒侵染模式植物拟南芥,这或许为研究RSV与植物寄主的互作机制提供了一条新的途径。当前,介体灰飞虱单层细胞培养体系逐渐成熟,这将在很大程度上大大加快RSV与介体互作机制的研究进程。作为经卵持久性虫传病毒,RSV是否是随着营养物质(卵黄原蛋白)运输途径进入卵母细胞,还是另有其他途径,也是需要深入研究的问题。此外,内生病毒HiPV是否影响灰飞虱对RSV的亲亲和性也有待进一步验证。我们相信,侵染性克隆、灰飞虱单层细胞系、昆虫微注射等技术体系的不断改进和突破,将大大促进RSV各方面的研究进程,也将最终实现对水稻条纹叶枯病的有效控制。

参考文献:

- [1] TORIYAMA S. Rice stripe virus (set 17) [M]. CMI/ABB: Description of Plant Viruses, 1983.
- [2] 朱凤美,肖庆璞,王法明,等. 江南稻区新发生的几种稻病[J]. 植物保护, 1964, 2(3): 100-102.
- [3] 程兆榜,杨荣明,周益军,等. 江苏稻区水稻条纹叶枯病发生新规律[J]. 江苏农业科学, 2002(1): 39-41.
- [4] 周益军. 水稻条纹叶枯病[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010.
- [5] XIONG R Y, CHENG Z B, WU J X, et al. First report of an outbreak of Rice stripe virus on wheat in China [J]. Plant Pathology, 2008, 57(2): 397.
- [6] KOGANEZAWA H, DOI Y, YORA K. Purification of rice stripe virus [J]. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1975, 41: 148-154.
- [7] 谢联辉,魏太云,林含新,等. 水稻条纹病毒的分子生物学[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(3): 269-279.
- [8] 阮义理. 日本水稻条纹叶枯病的研究进展[J]. 国外农学(水稻), 1986(5): 25-28.
- [9] YAO M, ZHANG T, ZHOU T, et al. Repetitive prime-and-realign mechanism converts short capped RNA leaders into longer

- ones that may be more suitable for elongation during rice stripe virus transcription initiation [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(1): 194-202.
- [10] SUN F, YUAN X, ZHOU T, et al. *Arabidopsis* is susceptible to Rice stripe virus infections [J]. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159: 767-772.
- [11] VAN POELWIJK F, PRINS M, GOLDBACH R. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 543-546.
- [12] RAMIREZ B C, HAENNI A L. Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(3): 467-475.
- [13] TAKAHASHI M, TORIYAMA S, KIKUCHI Y, et al. Complementarity between the 5'- and 3'-terminal sequences of rice stripe virus RNAs [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(12): 2817-2821.
- [14] XIONG R, WU J, ZHOU Y, et al. Identification of a movement protein of the tenuivirus rice stripe virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(24): 12304-12311.
- [15] TORIYAMA S. A RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67: 1247-1255.
- [16] TORIYAMA S, TAKAHASHI M, SANO Y, et al. Nucleotide sequence of RNA 1, the largest genomic segment of rice stripe virus, the prototype of the tenuiviruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(12): 3569-3579.
- [17] ELLIOTT R M. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70: 426-436.
- [18] TAKAHASHI M, TORIYAMA S, HAMAMATSU C, et al. Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2 [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(4): 769-773.
- [19] TAKAHASHI M, GOTO C, MATSUDA I, et al. Expression of rice stripe virus 22.8 k protein in insect cells [J]. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 1999, 65(3): 337.
- [20] DU Z, XIAO D, WU J, et al. p2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor [J]. *Mol Plant Pathol*, 2011, 12(8): 808-814.
- [21] LIANG D, QU Z, MA X, et al. Detection and localization of Rice stripe virus gene products *in vivo* [J]. *Virus Genes*, 2005, 31(2): 211-221.
- [22] LI S, LI X, SUN L J, et al. Gene products of rice stripe virus NS-ve2 were different in its two hosts [C]. Wisconsin, USA: Abstracts of 31st annual meeting of ASV, 2012.
- [23] ZHAO S, ZHANG G, DAI X, et al. Processing and intracellular localization of rice stripe virus Pc2 protein in insect cells [J]. *Virology*, 2012, 429(2): 148-154.
- [24] ZHU Y, HAYAKAWA T, TORIYAMA S, et al. Complete nucleotide sequence of RNA 3 of rice stripe virus; an ambisense coding strategy [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(4): 763-767.
- [25] 曲志才, 沈大棱, 徐亚南, 等. 水稻条纹叶枯病毒基因产物在水稻和昆虫体内的 Western 印迹分析 [J]. *遗传学报*, 1999, 26(5): 512-517.
- [26] XIONG R, WU J, ZHOU Y, et al. Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by Rice stripe tenuivirus [J]. *Virology*, 2009, 387(1): 29-40.
- [27] 刘利华, 吴祖建, 林奇英, 等. 水稻条纹叶枯病细胞病理变化的观察 [J]. *植物病理学报*, 2000, 30(4): 306-311.
- [28] 明艳林, 吴祖建, 谢联辉. 水稻条纹病毒 CP、SP 进入叶绿体与褪绿症状的关系 [J]. *福建农林大学学报*, 2001, 30(增刊): 147.
- [29] ZHU Y, HAYAKAWA T, TORIYAMA S. Complete nucleotide sequence of RNA 4 of rice stripe virus isolate T, and comparison with another isolate and with maize stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(5): 1309-1312.
- [30] 林奇田, 林含新, 吴祖建, 等. 水稻条纹病毒外壳蛋白和病害特异蛋白在寄主体内的积累 [J]. *福建农业大学学报*, 1998, 27(3): 322-326.
- [31] ZHOU Y, YUAN Y, YUAN F, et al. RNAi-directed down-regulation of RSV results in increased resistance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 965-972.
- [32] 张开玉, 熊如意, 吴建祥, 等. 水稻条纹病毒编码蛋白在灰飞虱体内的检测及其与 CP 体外结合研究 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4063-4068.
- [33] ZHANG C, PEI X, WANG Z, et al. The Rice stripe virus pC4 functions in movement and foliar necrosis expression in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Virology*, 2012, 425(2): 113-121.
- [34] BARBIER P, TAKAHASHI M, NAKAMURA I, et al. Solubilization and promoter analysis of RNA polymerase from rice stripe virus [J]. *J Virol*, 1992, 66(10): 6171-6174.
- [35] SHIMIZU T, TORIYAMA S, TAKAHASHI M, et al. Non-viral sequences at the 5' termini of mRNAs derived from virus-sense and virus-complementary sequences of the ambisense RNA segments of rice stripe tenuivirus [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77(3): 541-546.
- [36] HAMAMATSU C, TORIYAMA S, TOYODA T, et al. Ambisense coding strategy of the rice stripe virus genome; *in vitro* translation studies [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(6): 1125-1131.
- [37] LI S, LI X, SUN L J, et al. Analysis of rice stripe virus whole-gene expression in rice and in the small brown planthopper by real-time quantitative PCR [J]. *Acta Virologica*, 2012, 56(1): 75-79.
- [38] 林含新, 魏太云, 吴祖建, 等. 我国水稻条纹病毒 7 个分离物的致病性和化学特性比较 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2002, 31(2): 164-167.
- [39] 程兆榜, 任春梅, 周益军, 等. 水稻条纹病毒不同地区分离物的致病性研究 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(2): 126-131.
- [40] 魏太云. 水稻条纹病毒的基因组结构及其分子群体遗传 [D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
- [41] 程文金. 水稻条纹病毒 *RNA4* 基因间隔区分子变异与致病性关系 [D]. 福州: 福建农林大学, 2005.

- [42] GINGERY R E, NAULT L R, YAMASHITA S. Relationship between maize stripe virus and rice stripe virus [J]. J Gen Virol, 1983, 64(3): 1765-1770.
- [43] FALK B W, TSAI J H. Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*[J]. Annu Rev Phytopathol, 1998, 36: 139-163.
- [44] 刘海建. 水稻条纹病毒(RSV)免疫检测试剂盒研制与应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2005.
- [45] KISIMOTO R. Genetic variation in the ability of a plant hopper vector, *Laodelphax striatellus* Fallén to acquire the rice stripe virus [J]. Virology, 1967, 32: 144.
- [46] 刘海建,程兆榜,王跃,等. 灰飞虱传递水稻条纹病毒研究初报[J]. 江苏农业学报,2007, 23(5): 492-494.
- [47] 李小力. 灰飞虱与 RSV 亲和性相关的分子标记及 RSV 对灰飞虱生活力的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [48] LI S, XIONG R Y, WANG X F, et al. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between rice stripe virus and vector [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26585.
- [49] 李硕,孙丽娟,李醒,等. 灰飞虱高带毒(RSV)群体酵母双杂交 cDNA 文库的构建[J]. 昆虫学报, 2011, 54(11): 1324-1328.
- [50] 李硕. 灰飞虱体内水稻条纹病毒(RSV)互作因子的筛选及其功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [51] SUZUKI Y, FUJI S, TAKAHASHI Y, et al. Immunogold localization of rice stripe virus particle antigen in thin sections of insect host cells [J]. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1992, 58: 480-484.
- [52] HOGENHOUT S A, AMMAR E, WHITFIELD A E, et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses [J]. Annu Rev Phytopathol, 2008, 46: 327-359.
- [53] 邓金花. RSV 在昆虫介体灰飞虱体内的卵传机制及其非水稻寄主的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- [54] ZHANG F, GUO H, ZHENG H, et al. Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analyses of small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), a vector insect transmitting rice stripe virus (RSV) [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 303.
- [55] VAN DEN HEUVEL J F, VERBEEK M, VAN DER WILK F. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae* [J]. J Gen Virol, 1994, 75 (Pt10): 2559-2565.
- [56] 乐文静,史文琦,季英华,等. 灰飞虱体内 *Wolbachia* 的感染与其携带水稻条纹病毒的相关性分析[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 46-50.
- [57] 孙黛珍,江玲,张迎信,等. 8 个水稻品种的条纹叶枯病抗性特征[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 219-222.
- [58] NYT 2055—2011 水稻品种抗条纹叶枯病鉴定技术规范[S].
- [59] 周彤,周益军,程兆榜,等. 粳稻品种对水稻条纹叶枯病的抗性鉴定及抗病品种镇稻 88 的遗传分析[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 475-479.
- [60] 周彤,王磊,程兆榜,等. 主栽品种镇稻 88 对水稻条纹叶枯的抗性特征及其遗传研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 103-110.
- [61] ZHOU T, NELSON S C, HU J S, et al. Inheritance and mechanism of resistance to rice stripe disease in Zhendao 88, a Chinese rice cultivar [J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159: 159-164.
- [62] 陈洁. 主栽抗病品种对 RSV 的抗性特征和抗病转基因水稻材料的创制[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [63] 王贵珍,周益军,陈正贤,等. 水稻条纹病毒单克隆抗体的制备及检测应用[J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 302-306.
- [64] 周益军,刘海建,王贵珍,等. 灰飞虱携带的水稻条纹病毒免疫检测[J]. 江苏农业科学, 2004(1): 50-51.
- [65] NYT 2059—2011 灰飞虱携带水稻条纹病毒检测技术[S].
- [66] NYT 1609—2008 水稻条纹叶枯病测报技术规范[S].
- [67] 朱叶芹,杨荣明,刁春有. 江苏省水稻条纹叶枯病发生原因及治理对策[J]. 江苏农业科学, 2005(6): 29-30.
- [68] SHIMIZU T, NAKAZONO-NAGAOKA E, UEHARA-ICHIKI T, et al. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to rice stripe virus [J]. Plant Biotechnol J, 2011, 9: 503-512.

(责任编辑:汪恒英)