

## 水稻条纹病毒分子生物学研究进展

林含新 林奇英/谢联辉

(福建农业大学植物病毒研究所, 福州 350002)

5432.41  
5435.11.4

## Research Advances on Molecular Biology of Rice Stripe Virus

Lin Hanxin Lin Qiyang Xie Lianhui

(Institute of Plant Virology of Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002)

植物病毒

关键词 水稻条纹病毒, 分子生物学, 研究进展

Key words Rice stripe virus, Molecular biology, Research advance

水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)原是纤丝病毒组(Tenuivirus group)的典型成员。在1993年召开的国际病毒分类委员会(ICTV)第六次会议上, 纤丝病毒组改为纤丝病毒属(*Tenuivirus*)<sup>[1]</sup>。RSV由昆虫介体灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallen)以持久方式经卵传播。在禾谷类作物上有很广的寄主范围。RSV最早于1897年在日本发生, 目前仍是该国重要的水稻病毒; 除日本外, 该病毒在中国、朝鲜和乌克兰等国的稻区也造成极大的损失<sup>[2]</sup>。近5年来, 国内外对RSV分子生物学进行了大量的研究, 本文综述其研究进展。

## 1 病毒粒体形态与结构组分

## 1.1 粒体形态

从病株中分离到的病毒在电镜下为直径3 nm的分枝丝状体<sup>[3]</sup>或8 nm宽的丝状体<sup>[4]</sup>, 在两次蔗糖连续密度梯度离心后, 从下向上形成NB、B、M2和M1四个组分, 每个组分都含有一种ssRNA和一种dsRNA, dsRNA由ssRNA和它的互补RNA杂交退火而形成<sup>[5]</sup>。在电镜下, NB、B、M2和M1组分中的粒体分别为长2110、840、610和510 nm的环状丝状体, 有些分离物在离心后还可得到T组分, 该组分只含有ssRNA, 粒体长度为290 nm<sup>[6, 7]</sup>。

## 1.2 结构组分

RSV粒体由4种ssRNA和单一的外壳蛋白组成, ssRNA的分子量分别为 $3.1 \times 10^6$ (ssRNA1)、 $1.5 \times 10^6$ (ssRNA2)、 $1.2 \times 10^6$ (ssRNA3)和 $1.0 \times 10^6$ 道尔顿(ssRNA4); dsRNA的分子量分别为 $5.0 \times 10^6$ (dsRNA1)、 $2.8 \times 10^6$ (dsRNA2)、 $2.1 \times 10^6$ (dsRNA3)和 $1.7 \times 10^6$ 道尔顿(dsRNA4)<sup>[6]</sup>, 基因组全序列长17096个碱基<sup>[8-11]</sup>。其外壳蛋白分子量为32 kD, 由天门冬酰胺等16种氨基酸组成, 酸性氨基酸比例较高<sup>[12]</sup>。在提纯的RSV核蛋白中还发现一种分子量为230 kD的依赖于RNA的RNA聚合酶, 在体外该聚合酶可以合成RSV的4种ssRNA<sup>[13]</sup>。此外, RSV基因组还可以编码5种非结构性蛋白(表1), 其中NS4蛋白, 即病害特异性蛋白(Disease-specific protein, SP)能在病株中大量聚集, 在试管内可形成针状结晶, 相当于感病水

稻细胞中观察到的晶状内含体<sup>[14]</sup>,而其余蛋白皆未发现。

RSV 基因组的每一个 RNA 区段(Segment)都有两个共同的特性,即 5'和 3'末端序列的保守性和互补性。其中, RNA2、RNA3、RNA4 的 3'末端具有共同的序列 5'GACUUUGUGU3';而 5'端 4 种 RNA 则具有 5'ACACAAAGUCC3'的相同序列。而且每种 RNA 的 5'端和 3'端都有 20 个碱基是互补配对的,形成了负链病毒特征性的柄柄(Panhandle)结构(图 1),这种稳定的碱基配对结构可能导致电镜下所观察到的环状结构,柄柄结构上的互补区域可能是 RNA 聚合酶的识别位点,而第 6 个碱基的错配可能与复制和转录以及(或者)与粒体装配有关<sup>[17]</sup>。Barbier 等(1992)<sup>[18]</sup>的实验证实了 3'末端的保守序列对 RSV 中的聚合酶来说是充当了启动子的作用。

表 1 水稻条纹病毒基因组结构和功能\*

Table 1 Genomic organization and functions of RSV

区段 Segment	核苷酸数 nt	编码链 Coding strand	编码蛋白(分子量 kD) Protein(MW kD)	蛋白功能 Functions	引用文献 References
RNA1	8970	vcRNA1	Pol(336.8)	RNA 聚合酶	11
RNA2	3514	vRNA2	NS2(22.8)	参与复制(?)	10
		vcRNA2	NSc2(94.0)	糖蛋白(?)	
RNA3	2475/ 2504	vRNA3	NS3(23.8)	不清楚	9, 15
	vcRNA3	NC(35.1)	外壳蛋白		
RNA4	2137/ 2157	vRNA4	NS4(20.5)	病害特异性蛋白	8, 16
	vcRNA4	NSc4(32.4)	不清楚		

\*表中各个蛋白的分子量是从开放阅读框核苷酸序列估算而来, SDS-PAGE 分子量测定结果是: RNA 聚合酶 230 kD, 外壳蛋白 32 kD, 病害特异性蛋白 17.5~21 kD。

病毒粒体的环状结构及碱基配对结构同样在动物病毒布尼安病毒科(Bunyaviridae)的白蛉热病毒(Phlebovirus)的基因组中发现<sup>[19]</sup>,而且,白蛉热病毒基因组的末端有 8 个保守的核苷酸序列与 RSV 是完全一致的<sup>[20]</sup>。这些结果表明白蛉热病毒与 RSV 在系统发育上存在着亲缘关系<sup>[8, 17]</sup>。

## 2 基因组结构、组成和功能, 表达策略

RSV 基因组的全序列都已测定(图 2), 结果发现 RNA1 采取负链编码策略, 而 RNA2、RNA3 和 RNA4 都是采取双义编码策略(Ambisense coding strategy), 即在 RNA 的毒义链(Viral sequence, vRNA)和毒义互补链(Viral complementary sequence, vcRNA)上都各有一个大的开放阅读框(ORF), 都可编码蛋白质, 这一点已被 Hamamatsu 等(1993)<sup>[21]</sup>的体外转译实验所证实。双义编码策略已在布尼安病毒科的白蛉热病毒的 S 区段、番茄斑萎病毒(TSWV)的 S、M 区段以及沙粒病毒科(Arenaviridae)的两个区段中报道过, 但 RSV 是所报道的具有三个双义区段的第一个植物病毒<sup>[8, 9, 20]</sup>。

### 2.1 RNA1 区段

RNA1 全长 8970 个核苷酸, 是 RSV 基因组中最大的区段, 在 vcRNA1 上有一个长的 ORF, 它编码分子量为 336860 的 RNA 聚合酶(Pol 蛋白), 该蛋白与白蛉热病毒的 L 蛋白有 30% 的同源性, 这些同源性序列包含 Pol 蛋白的基元序列(Motif)<sup>[11]</sup>。

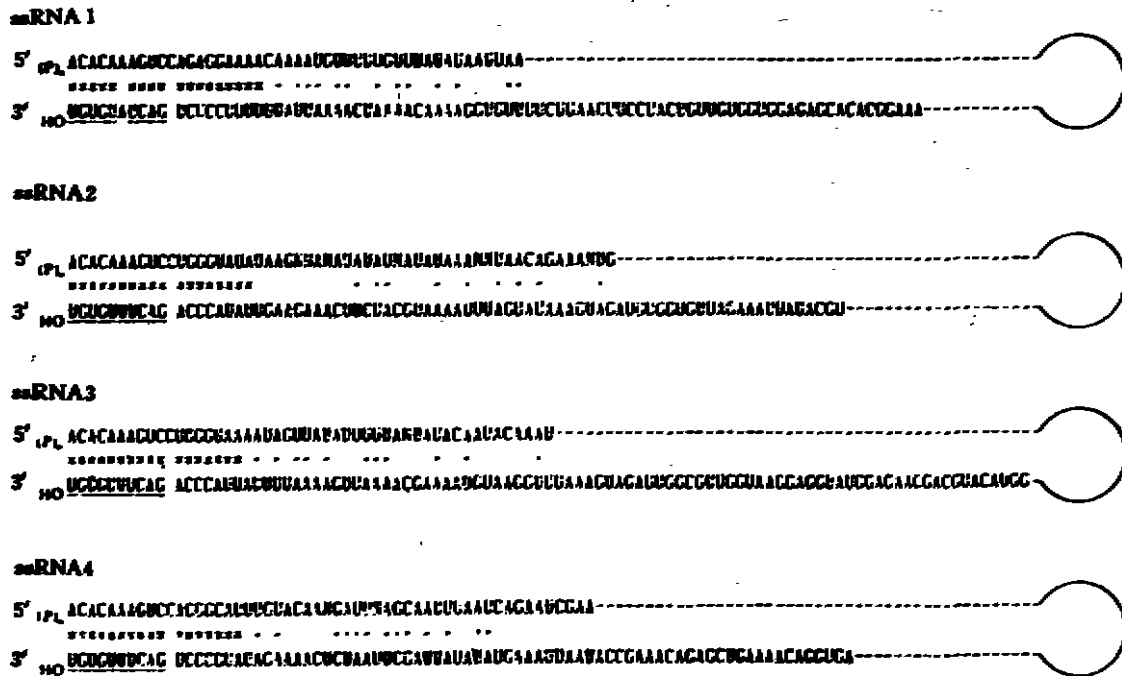


图1 RSV 四个 ssRNA 区段末端序列及可能的柄状结构。\* 为形成柄柄的氢键位置, 为其它互补碱基对, 下划线为保守序列, 引自 M. Takahashi 等(1990)。

Fig. 1 Terminal sequences and possible panhandle structures of the four ssRNA segments. The position of hydrogen bonds forming the panhandle are indicated by '\*' and other complementary base pairs are indicated by '.', conserved sequences are underlined. From M. Takahashi *et al* (1990).

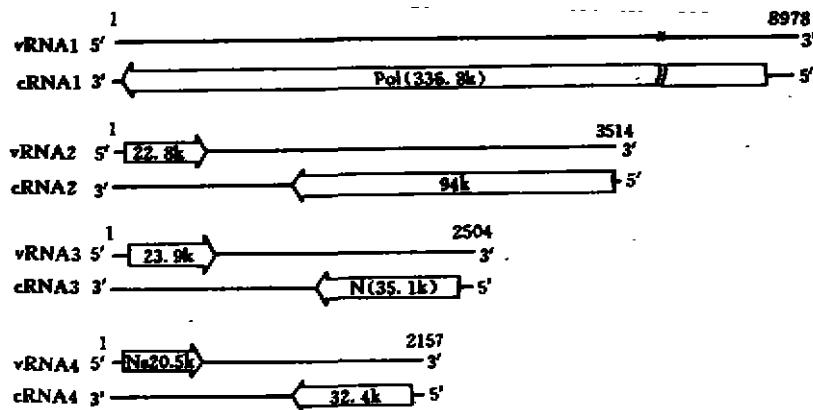


图2 RSV 基因组结构和编码区排列。黑线为基因组 RNAs, 末端标有其核苷酸数目。ORF 及其方向在 vRNA 和 cRNA 链上用箭头标出。Pol 为 RNA 聚合酶, N 为核衣壳蛋白, Ns 为非结构性蛋白。引自 S. Toriyama 等(1994)。

Fig. 2 Genome structure and coding arrangement of RSV. Black lines are genomic RNA, with the nucleotide numbers on both ends. The ORF and its direction are indicated with arrows on vRNA and dsRNA. Pol: RNA polymerase protein; N: nucleocapsid; Ns: non-structural protein. From S. Toriyama *et al* (1994).

## 2.2 RNA2 区段

RNA2 全长 3514 bp, 在 vRNA2 和 vcRNA2 的近 5' 区各有一个 ORF, 分别编码分子量为 22.8 kD(NS2) 和 94 kD(NSvc2) 的蛋白, 其中 NSvc2 的氨基酸序列与白蛉热病毒属中的乌库尼米病毒(Uukuniemi, UUK) 和 Punta Toro 病毒(PT) 的糖蛋白(G1 和 G2) 序列有同源性, 这也表明了这些病毒之间的亲缘关系<sup>[10]</sup>。

## 2.3 RNA3 区段

已测定了两个病毒分离物的 RNA3 核苷酸序列, 其中 M 分离物长为 2475 bp<sup>[9]</sup>, T 分离物长 2504 bp<sup>[15]</sup>。与 RNA2 一样, 在 RNA3 的正链和负链上各有一个 ORF, 分别编码分子量为 23.8 kD(NS3) 和 35.1 kD(NSvc3) 的两个蛋白, 其中 NSvc3 为外壳蛋白, 该蛋白与 PT 及同属成员玉米条纹病毒(MStV) 的外壳蛋白的氨基酸序列具有 44% 的同源性。在正链和负链的两个 ORF 之间有一非编码基因间隔区(IR), 含有几个 U 和 A 碱基富集带, 计算机折叠分析揭示 IR 区序列包含一个反向的互补序列, 能形成茎-环结构(Stem-loop), 在 PT、UUK、TSWV 的 RNA S 区段上也发现了相似的二级结构, 这种结构可能具有终止 mRNA 转录及保持 ssRNA 稳定性的作用<sup>[22]</sup>。

此外, 我国 RSV C 分离物的外壳蛋白基因也已完成测序, 结果发现 C 分离物的 CP 基因由 966 个核苷酸组成, 与日本 T 分离物的 CP 基因相比, 两者核苷酸序列同源性为 97.0%, 氨基酸序列的一致性为 99.0%; 与 M 分离物相比, 也有 97.0% 的核苷酸同源性和 99.0% 的氨基酸序列一致性<sup>[23-25]</sup>。

## 2.4 RNA4 区段

测定了 T 和 M 两个分离物的 RNA4 核苷酸序列, RSV-M 为 2137 bp<sup>[8]</sup>, RSV-T 为 2157 bp<sup>[16]</sup>。RNA4 区段利用双义编码策略, vRNA4 上的 ORF 编码病害特异性蛋白(SP), 该蛋白能在病株中大量聚集, 形成不定形内含体和针状结构<sup>[23]</sup>。SP 与 MStV 的相应蛋白有 70% 的氨基酸一致性, 而与同属的水稻白叶病毒(RHBV) 的 SP 只有 59% 的一致性, 这反映了纤细病毒属各成员之间的亲缘关系, 表明 RSV 和 MStV 之间的关系比与 RHBV 之间的关系更近<sup>[24]</sup>。RNA4 链上的基因间非编码区内同样存在 U 和 A 碱基富集带及可能的茎-环或发夹(Hairpin) 二级结构(图 3)。两个分离物序列比较研究发现, ORF1 和 ORF2 分别有 97.2% 和 98.0% 的一致性, 氨基酸水平上也有 93.3% 和 98.2% 的相似性, 相对于 M 分离物, 在 T 分离物的基因间非编码区内有一个长为 20 个碱基的插入序列, 这种插入或缺失在番茄斑萎病毒的两个分离物的 S 区段上也观察到, 这表明基因间非编码区可能具有更高级的结构, 且易于变异。但 T 和 M 分离物的前导序列是一致的, 这暗示着前导序列在 RNA 的复制和(或)蛋白的转译方面具有重要的作用<sup>[18]</sup>。

## 3 RSV 的基因工程

RSV 分子生物学研究对抗病毒转基因工程植株的策略设计具有极为重要性。最近 Hayakawa 等<sup>[25]</sup>报道, 表达外壳蛋白基因的转基因水稻植株对 RSV 的感染表现出一定水平的保护作用。几乎同时, 我国燕义唐等在对 RSV CP 基因的克隆、测序的基础上, 把 CP 基因转入水稻, Western blot 测定结果显示了 CP 基因在工程植株中表达<sup>[26-29]</sup>。

## 4 小结和展望

对水稻条纹病毒的深入研究是建立在分子生物学技术的基础上, 如基因克隆和核苷酸测

序的技术,这些技术使我们初步了解 RSV 基因组的结构和表达策略。RSV 基因组的四个区段中,除 RNA1 为负链外,其它三个都是双义区段,这在植物病毒中是非常独特的。目前,只有番茄斑萎病毒(TSWV)也是采取双义编码策略的,但 TSWV 已归属于动物病毒布尼安病毒科中。对 RSV 仍缺乏更深入的了解,如基因组的转录、复制、所编码蛋白的功能、病毒-植物和病毒-昆虫相互作用及共同演化的分子机制等。

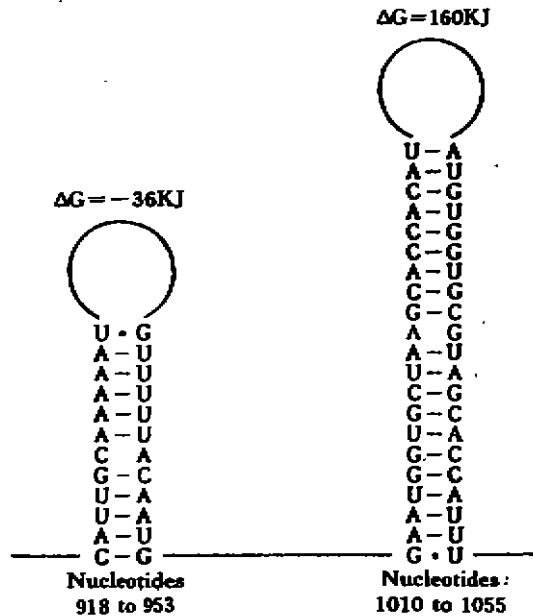


图3 ssRNA4 基因间非编码区内两个可能的发夹结构。破折号:茎区的碱基配对,  $\Delta G$ : 自由能。标出了形成发夹结构的核苷酸位置(距 5' 末端)。引自 Zhu 等(1992)。

Fig. 3 The two predicted hairpin structures in the intergenic non-coding region on ssRNA4. Dash: base pairing in the stem region,  $\Delta G$ : the free energy, the nucleotide positions are showed (from the 5' termini). From Zhu *et al* (1992).

对 RNA 聚合酶的提纯和定性及聚合酶基因的研究,使体外转录体系的建立成为可能,而这对 RNA 合成过程,如从转录至复制如何过渡的研究,也是必不可少的。同时,有必要建立一个水稻原生质体和昆虫细胞培养体系,以便研究病毒如何复制,SP、CP 如何表达,病毒如何致病。

RSV 基因组可能编码的蛋白中,除 RNA 聚合酶、外壳蛋白、病害特异性蛋白外,其余蛋白皆未发现,功能也不清。序列比较发现, RHBV 的 SP 与烟草脉斑驳病毒(TVMV)的蚜传辅助因子有 35% 的氨基酸一致性,这种相似性暗示着 RSV 的 SP 也可能与飞虱的病毒传播能力有关<sup>[24]</sup>。另外,在不同的病毒分离物或寄主植物(水稻、玉米、小麦)中,SP 的分子量是不同的,在不同抗性的水稻体内的积累量也有差异<sup>[8, 16, 23, 30]</sup>,这是否暗示 SP 在病毒-寄主的相互作用及共同演化过程中充当一种信号分子的角色? 根据 RSV RNA2 编码的 94k 蛋白与 PT、UUK 病毒的膜糖蛋白的序列相似性,可推测 RSV 包膜粒体存在的可能性,尽管到目前为止,这类粒体还未发现,这种糖蛋白也可能与昆虫细胞识别病毒的能力有关<sup>[31]</sup>。

从 RSV 与白蛉热病毒属、番茄斑萎病毒属基因组序列的比较研究可发现,这些病毒之间存在着平行对应关系,其中 RSV RNA1 区段与白蛉热病毒、番茄斑萎病毒的 L 区段相对应, RNA2 与 M 区段相对应,而 RNA3 和 RNA4 与 S 区段也具有一些共性,因为 S 区段编码的外壳蛋白和 NSs 蛋白,可分别对应于 RNA3 和 RNA4 所编码的外壳蛋白和病害特异性蛋白,但 RNA3 和 RNA4 上还各有一个 ORF,它们所编码的蛋白,是否参与了病毒在植物细胞间的运

输及对昆虫细胞的识别<sup>[31]</sup>?

综上所述,RSV与白蛉热病毒属、番茄斑萎病毒属具有共同的基因组结构和表达策略,在基因组可能的二级结构上也具有共性,再考虑到它们都能在植物和昆虫体内增殖的特性,表明这些病毒之间存在着进化上的亲缘关系,所以建议RSV所在的纤丝病毒属归属于布尼安病毒科<sup>[11,32]</sup>。

对病毒分子生物学的研究,其主要目标是为了能有效而持久地控制病毒病的为害。目前,在对RSV的转基因工程防治病毒病的研究中,已转化出的工程植株都是采取CP基因策略的,但结果并不理想,CP表达水平低或植株抗性不高<sup>[28,29]</sup>,是否可以考虑采取其他的策略呢?如核酶策略或复制酶基因策略。刘力等<sup>[30]</sup>已设计出一个针对RSV RNA保守区和SP基因的核酶,并发现该核酶在体外具有切割RSV核酸的活性。但直到目前为止,尚未见转核酶基因的工程植株抗病毒的成功例子,这可能与核酶在细胞中的定位及反义RNA(包括核酶)和靶RNA的杂交体在动力学上有一种瓦解倾向有关<sup>[33]</sup>。而在已报道的一些利用复制酶基因策略的例子中,所得到的转化植株都表现出对病毒的高度抗性<sup>[34]</sup>,所以在RSV的抗病毒基因工程中很有必要在这方面作进一步的研究。

### 参 考 文 献

- Murphy FA, Fanaquet CM, Bishop DHL *et al* eds. Classification and nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1995, Suppl 10: 316
- 林奇英, 谢联辉, 周仲驹等. 水稻条纹叶枯病的研究 I. 病害的分布和损失. 福建农学院学报, 1990, 19(4): 421-425
- Koganezawa H, Doi Y, Yora K. Purification of rice stripe virus. Annuals of the Phytopathological Society of Japan, 1976, 41: 148-164
- 谢联辉, 周仲驹, 林奇英等. 水稻条纹叶枯病的研究 III. 病害的病原性质. 福建农学院学报, 1991, 20(2): 144-149
- Toriyama S, Watanabe Y. Characterization of single- and double-stranded RNAs in particles of rice stripe virus. Journal of General Virology, 1989, 70: 505-511
- Isikawa K, Omura T, Hibino H. Morphological characteristics of rice stripe virus. Journal of General Virology, 1989a, 70(12): 3465-4568
- Isikawa K, Omura T, Tsuchizaki T. Association of double- and single-stranded RNAs with each four components of rice stripe virus. Annuals of the Phytopathological Society of Japan, 1989b, 35(3): 315-323
- Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T *et al*. Ambisense segment 4 of rice stripe virus; possible evolutionary relationship with phleboviruses and uukuviruses (Bunyaviridae). Journal of General Virology, 1990, 71: 1427-1432
- Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T *et al*. Ambisense segment 3 of rice stripe virus: the first instance of a virus containing two ambisense segments. Journal of General Virology, 1991, 72(2): 465-468
- Takahashi M, Toriyama S, Hamamatsu C *et al*. Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2. Journal of General Virology, 1993, 74(4): 769-773
- Toriyama S, Takahashi M, Sano Y *et al*. Nucleotide sequence of RNA1, the largest genomic segment of rice stripe virus, the prototype of the tenuiviruses. Journal of General Virology, 1994, 75: 3569-3579
- Toriyama S. Chemical compositions of coat protein of rice stripe virus and stripe disease specific protein. Annuals of the Phytopathological Society of Japan, 1983b, 49: 432
- Toriyama S. An RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus. Journal of General Virology, 1986a; 67: 1247-1255
- Kiso A. Infection and symptom in rice stripe disease with special reference to disease-specific protein other than virus. Re-

- view of Plant Protection Research, 1973, 6:75~100
- 15 Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA3 of rice stripe virus: an ambisense coding strategy. *Journal of General Virology*, 1991, 72:763~767
  - 16 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. *Journal of General Virology*, 1992, 73:1309~1312
  - 17 Takahashi M, Toriyama S, Hamamatsu C *et al.* Complementarity between the 5' - and 3' - terminal sequences of rice stripe virus RNAs. *Journal of General Virology*, 1990, 71:2817~2821
  - 18 Barbier P, Takahashi M, Nakamura I *et al.* Solubilization and promoter analysis of RNA - polymerase from rice stripe virus. *Journal of Virology*, 1992, 66:6171~6174
  - 19 Elliott RM. Molecular biology of the Bunyaviridae. *Journal of General Virology*, 1990, 71:501~522
  - 20 Bouloy M. Bunyaviridae: genome organization and replication strategies. *Advance in Virus Research*, 1991, 40:235~275
  - 21 Hamamatsu C, Toriyama S, Toyoda T *et al.* Ambisense coding strategy of the rice stripe virus genome: *in vitro* translation studies. *Journal of General Virology*, 1993, 74:1125~1131
  - 22 Auperin DD, Romanowski M, Galinski M *et al.* Sequence studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *Journal of General Virology*, 1984, 52:897~904
  - 23 洪益国, 裴美云, 王小凤等. 水稻条纹叶枯病毒分子生物学的研究 I. 外壳蛋白分子量、氨基酸组成和 N 末端. *科学通报*, 1990, 35(16):1265~1267
  - 24 邱并生, 王晋芳, 田波等. 水稻条纹叶枯病毒分子生物学的研究 II. 外壳蛋白基因的合成、克隆和表达. *科学通报*, 1991, 36(20):1578~1581
  - 25 王晋芳, 邱并生, 田波等. 水稻条纹叶枯病毒分子生物学的研究 III. 外壳蛋白基因的序列分析. *中国病毒学*, 1992, 7(4):463~466
  - 26 Toriyama S. Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicated in plants and insects. *Microbiological Sciences*, 1986b, 3:347~351
  - 27 Ramirez BC, Lozano I, Constantino LM *et al.* Complete nucleotide sequence and coding strategy of rice hoja blanca virus RNA 4. *Journal of General Virology*, 1993, 74:2463~2468
  - 28 Hayakawa T, Zhu Y, Itoh K *et al.* Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect - transmitted virus. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 1992, 89:9865~9869
  - 29 燕义唐, 王晋芳, 邱并生等. 水稻条纹叶枯病毒外壳蛋白基因在工程水稻植株中的表达. *植物学报*, 1992, 34(12):899~906
  - 30 刘力, 陈声祥, 邱并生等. 抗水稻条纹病毒核酶的设计、克隆及体外活性测定. *中国病毒学*, 1996, 11(2):157~163
  - 31 Hayashi T, Usugi T, Nakano M *et al.* On the strains of rice stripe virus (1) An attempt to detect strains by difference in molecular size of disease - specific proteins. *Proceeding of the Association for Plant Protection of Kyushu*, 1989, 35:1~2
  - 32 Ramirez BC, Haenni AL. Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses. *Journal of General Virology*, 1994, 75:467~475
  - 33 刘玉乐, 田波. 抗病植物基因工程的研究进展. *中国病毒学*, 1993, 8(1):7~15
  - 34 项瑜, 杨兰英, 彭学贤等. 改造的马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导高度抗病性. *生物工程学报*, 1996, 12(3):258~265