

· 专题论坛 ·

玉米粗缩病的分子研究新进展

李荣改^{1*}, 陆艳梅¹, 王月影², 王宝强¹, 宋炜¹, 张文英¹

¹河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北省作物遗传育种实验室, 石家庄 050035; ²河北农业大学生命科学学院, 保定 071001

摘要 粗缩病是一种世界性玉米(*Zea mays*)病害, 造成玉米产量降低和品质下降。已有的研究表明, 导致玉米粗缩病的病毒有4种, 均属于植物呼肠孤病毒科、斐济病毒属(*Fijivirus*)第2组的成员, 它们的全基因组均由10条双链RNA片段组成, 编码13个蛋白分子; 迄今未发现对粗缩病完全免疫的研究材料, 但已筛选出少量在不同环境下均表现高抗的种质。玉米抗粗缩病为多基因控制的数量性状, 每条染色体上均有可能存在与粗缩病抗性有关的基因座(QTLs)。粗缩病毒侵染玉米后, 引起细胞防御系统中相关基因表达、蛋白质合成和激素含量等生物途径发生变化。该文对玉米粗缩病病原分子特征和遗传变异、抗性种质遗传基础及致(抗)病机理等方面的研究成果进行了阐述, 旨在为玉米抗粗缩病分子育种提供理论依据。

关键词 基因, 玉米, 粗缩病毒, 致病机理, 抗病机理

李荣改, 陆艳梅, 王月影, 王宝强, 宋炜, 张文英 (2017). 玉米粗缩病的分子研究新进展. 植物学报 52, 375–387.

玉米(*Zea mays*)粗缩病是一种公认的世界性病害, 自1949年在意大利被发现后, 相继在欧洲、南美洲和亚洲的一些国家发生。经过近70年的研究, 已知玉米粗缩病是一种经飞虱(灰、白背飞虱)传播的病毒病。科学家不仅探明了玉米粗缩病的发病流行规律, 建立了玉米粗缩病抗性鉴定的方法, 制定出抗性评价标准; 而且对抗性种质资源进行了广泛的筛选和鉴定。随着分子生物学的不断发展, 近年在分子水平上对玉米粗缩病病原、抗原基因及抗(致)病机理展开了研究。本文对病原分子特征和遗传变异、抗性种质遗传基础和机理等方面的最新研究进展进行了阐述, 以加深读者对玉米粗缩病分子生物学基础的认识, 同时为玉米抗粗缩病种质改良提供有益的信息。

1 玉米粗缩病病原

玉米可被100多种病原体侵染, 而且在自然条件下是50多种病毒的寄主, 其中至少有10种来自5个不同科属的病毒可对玉米造成严重的危害(Ali and Yan, 2012; Zambrano et al., 2014)。玉米粗缩病的致病病毒主要有4种, 包括玉米粗缩病毒(maize rough dwarf virus, MRDV)、MRCV (Mal de Río Cuarto virus)、水稻(*Oryza sativa*)黑条矮缩病毒(rice black

streaked dwarf virus, RBSDV)以及南方水稻黑条矮缩病毒(south rice black streaked dwarf virus, SRBSDV), 在植物病毒分类学上均属于植物呼肠孤病毒科(Plant Reoviruses)、斐济病毒属(*Fijivirus*)第2组的成员。这4种病毒在病毒粒子形态、寄主范围、传播介体、血清学和基因组序列等方面都非常相似, 具有系统侵染特性, 主要由传毒介体灰飞虱及白背飞虱以持久增殖型方式传播。在欧洲、中东及北美地区, 玉米粗缩病是由MRDV所致(Milne et al., 1973); 在阿根廷、巴西和乌拉圭等南美地区是由MRCV所致(Distéfano et al., 2003); 而在我国主要是由RBSDV引起(Fang et al., 2001; 张恒木等, 2001)。但近年在长江流域及山东济宁地区发现了感SRBSDV的玉米粗缩病株(Yin et al., 2011; Cheng et al., 2013), 表明新发现的SRBSDV病毒不仅侵染水稻, 引起水稻黑条矮缩病, 而且可侵染玉米, 导致粗缩病。目前对这4种病毒引起的症状观察、病原物鉴定和检测都已经很完善, 而对病毒分子水平的研究主要集中在全基因组测序和基因克隆方面, 对病毒基因编码蛋白的功能及其致病机理研究还不够深入。

已有的研究表明, 导致玉米粗缩病的4种病毒全基因组均由10条双链RNA (dsRNA)片段组成, 其全基因组测序工作均已完成, 10条dsRNA片段均在

收稿日期: 2016-05-06; 接受日期: 2016-08-23

基金项目: 河北省重点研发计划(No.16226323D)和河北省农林科学院博士基金(No.BS201504)

* 通讯作者。E-mail: lironggai@hotmail.com

1.8–4.5 kb之间,由大到小分别命名为S1–S10。每条片段的末端序列均具有1段呼肠孤病毒科特有的保守序列: 5'-AAGUUUUU……CAGCUNNNGUC-3'。尽管这4种病毒的分子组成结构相似,但其在核酸序列上仍存在差异。

1.1 水稻黑条矮缩病毒分子特征

水稻黑条矮缩病毒主要分布于朝鲜、韩国、日本和中国等亚洲国家。完整的RBSDV是包含球状突起、管状突起和核心粒子的等二十面体结构,直径为75–80 nm的双层外壳包被的球形病毒,内外层衣壳上各存在12个突起,外层突起称为A-突起(A-spike),内层突起称为B-突起(B-spike) (安德荣和慕小倩, 1996)。RBSDV的基因组全长29 142 bp,含有13个开放阅读框(open reading frame, ORF)。除S5、S7和S9外,其余7条基因组片段均为单顺反子,分别只编码1个蛋白, S5含有2个部分重叠的ORFs, S7和S9含有非重叠的ORFs,可编码2个蛋白(表1)。通过对每个基因编码的氨基酸序列进行预测,并与其它已知功能的呼肠孤病毒成员氨基酸序列进行同源性比对,可推测各RBSDV基因编码蛋白的分子功能(Isogai et al., 1998; Zhang et al., 2001; 张恒木等, 2002; Wang et al., 2003)。S1编码的蛋白P1具有RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)的GDD (Glycine-Aspartate-Aspartate)特征结构域,推测其为依赖于RNA的RNA聚合酶(张恒木, 2001)。P2为病毒粒子的主要衣壳蛋白。根据P3氨基酸序列所具有的功能结构域和序列同源性比较分析,推测P3具有类似mycorevirus-1VP3的鸟苷酸转移酶(Guanlyltransferase)的功能(方守国等, 2001; Supyani et al., 2007)。P4为病毒B-突起结构蛋白,参与病毒mRNA的分泌过程(Wang et al., 2003)。S5可编码分子量分别为106.8 kDa的结构蛋白(P5-1)和26.5 kDa的非结构蛋白(P5-2),与已知的NLRV (*Nilaparvata Lugens* reovirus)基因组相比较,推测P5-2可能对病毒在寄主体内的繁殖起着重要作用(Yang et al., 2014; 羊健, 2014)。最近的研究表明,在寄主体内, P5-1和P5-2以双顺反子RNA的形式存在, P5-1作为病毒基质的组成成分之一可与P6互作(Li et al., 2013; Yang et al., 2014), P5-2则有针对性地作用于寄主细

胞的叶绿体(Liu et al., 2015)。P6为病毒粒子非结构蛋白,采用农杆菌侵染法以及重组的马铃薯(*Solanum tuberosum*) X病毒(PVX)表达载体研究其功能,发现该蛋白为植物基因RNA沉默抑制子,对植物基因组DNA甲基化过程起着强烈的抑制作用(Zhang et al., 2005)。S7可编码分子量分别为41.2和36.4 kDa的2个非结构蛋白P7-1和P7-2,利用血清学分析和细胞内定位研究证实P7-1在介体昆虫细胞中参与管状结构的形成,从而作为病毒在寄主细胞间运动的通道(Isogai et al., 1998; 钟永旺等, 2003), P7-2可能参与病毒在植物体内的复制(Nakashima et al., 1996),最近研究发现P7-2为F-box蛋白,作为泛素连接酶E3的核心亚基在病毒侵染过程中参与泛素途径(Wang et al., 2013)。P8为病毒粒子次要衣壳蛋白,可能具有NTP结合活性(Isogai et al., 1998)。P8以二聚体的形式存在,是病毒编码的核转录调节因子,在病毒与寄主(病毒介体灰飞虱和寄主玉米植株)互作时,通过它的N-端1–40的氨基酸序列侵入寄主的细胞核内,并作为寄主基因表达的转录抑制因子调控寄主的基因表达,在病毒与寄主互作过程中发挥作用(Liu et al., 2007a)。S9编码分子量分别为39.9 kDa的P9-1与24.2 kDa的P9-2两个非结构蛋白。对P9-1的分子结构和功能研究证实, P9-1是一种 α 螺旋形式的多肽且具有自激活活性(Zhang et al., 2008),是组成病毒基质(viroplasm)所需的最小组成分子,病毒粒子通过P9-1自我互作或与P6蛋白互作形成类病毒基质来招募组成病毒基质的分子(Wang et al., 2011),在寄主细胞内为病毒提供复制和组装的场所,因此该蛋白在病毒生命周期的早期阶段发挥重要作用(Zhang et al., 2008; Wu et al., 2013)。P7-1和P9-1均可在被侵染的寄主植物和介体灰飞虱虫体中积累,表明它们可能参与病毒向寄主细胞转移的过程。进一步研究表明, P7-1在传毒介体灰飞虱和寄主中的表达水平最高,证明其在病毒-寄主的互作中起主导作用(Xu et al., 2015)。相反,未在被侵染的寄主植株和介体灰飞虱虫体中发现P7-2和P9-2,表明它们可能只在原RBSDV病毒中表达,其功能有待进一步研究(Isogai et al., 1998)。P10为外壳蛋白,通常以低聚体形式存在,也可通过N-端第230位氨基酸发生自我互作产生二聚体形式,形成RBSDV粒子的1个主要结构蛋白

表1 侵染玉米的4种粗缩病毒分子基因组比较

Table 1 Comparison of genome of four viruses causing maize rough dwarf disease

基因组片段	病毒	全长(bp)	开放阅读框(ORFs)	蛋白质分子量(kDa)	蛋白功能
S1	RBSDV	4501	36-4430	168.8	RNA依赖性RNA聚合酶
	SRBSDV	4500	37-4431	169	RNA依赖性RNA聚合酶
	MRDV	4501	36-4430	168.7	RNA依赖性RNA聚合酶
	MRCV	4501	38-4432	168.4	RNA依赖性RNA聚合酶
S2	RBSDV	3812	46-3726	141.3	外壳蛋白
	SRBSDV	3815	46-3726	141	核心衣壳
	MRDV	3813	47-3727	141.5	未知
	MRCV	3826	47-3727	141.7	B-突起蛋白
S3	RBSDV	3572	14-3441	132.0	鸟苷酸转移酶
	SRBSDV	3618	34-3543	135	鸟苷酸转移酶
	MRDV	3573	15-3455	132.1	未知
	MRCV	3826	47-3727	141.7	核心蛋白
S4	RBSDV	3617	34-3543	135.6	B-突起蛋白
	SRBSDV	3571	15-3455	132	B-突起蛋白
	MRDV	3617	34-3543	135.4	结构蛋白
	MRCV	3617	34-3549	134.4	未知
S5	RBSDV	3164	16-2827	106.8	次要核心结构蛋白
			2378-3071	26.5	非结构蛋白
	SRBSDV	3165	16-2835	108	未知
			2499-3076	24	未知
S6	MRDV	3164	16-2829	107.1	次要核心结构蛋白
			2462-3073	23.6	非结构蛋白
	MRCV	3162	16-2814	106.9	未知
	RBSDV	2645	81-2460	89.6	RNA沉默抑制子
S7	SRBSDV	2651	82-2463	90	RNA沉默抑制子, 基质形成
	MRDV	2645	82-2460	89.8	未知
	MRCV	2639	80-2446	90.01	未知
	RBSDV	2193	42-1130	41.2	参与管状结构形成
S8			1183-2112	36.4	非结构蛋白
	SRBSDV	2176	41-1114	41	参与管状结构形成
			1166-2095	36	未知
	MRDV	2193	42-1130	41.1	参与管状结构形成
S9			1183-2112	36.2	非结构蛋白
	MRCV	2186	41-1126	41.5	非结构蛋白
			1176-2105	36.8	非结构蛋白
	RBSDV	1927	25-1800	68.1	核转录调控因子
S10	SRBSDV	1928	25-1800	68	核转录调节因子
	MRDV	1936	25-1800	68	核心衣壳
	MRCV	1931	25-1800	68.3	NTP结合蛋白
	RBSDV	1900	52-1095	39.9	毒基质的形成, 参与病毒复制
S11			1160-1789	24.2	非结构蛋白
	SRBSDV	1900	52-1095	40	毒基质的形成, 参与病毒复制
			1159-1788	24	未知
	MRDV	1900	52-1095	39.9	毒基质结构
S12			1160-1789	24.2	非结构蛋白
	MRCV	1870	52-1065	39.1	ATP酶活性
			1223-1759	20.5	非结构蛋白
	RBSDV	1801	22-1698	63.3	外层衣壳
S13	SRBSDV	1798	22-1695	63	外层衣壳
	MRDV	1802	23-1699	63.2	外层衣壳
	MRCV	1798	23-1696	63.5	外层衣壳

(Liu et al., 2007b)。

1.2 南方水稻黑条矮缩病毒分子特征

南方水稻黑条矮缩病毒于2001年被发现, 2008年被鉴定(Zhou et al., 2008)。其病毒粒子形态和基因组组成与RBSDV最相似。它在田间主要的传毒介体是白背飞虱, 灰飞虱也可传毒, 但传毒效率低(Zhou et al., 2008)。经测序和序列比较, SRBSDV与RBSDV的基因组序列同源性较高, 核苷酸和氨基酸序列的同源性分别介于70.6%–78.9%和63.1%–89.0%之间(Wang et al., 2003, 2010; Zhou et al., 2013)。SRBSDV基因组10条dsRNA片段序列全长为29 124 bp, 与RBSDV一样含有13个ORFs, 其S5、S7和S9含有2个ORFs, 编码2个蛋白, 其余片段均只包含1个ORF (表1) (Wang et al., 2010)。基因组序列比较分析表明, 与RBSDV一样, SRBSDV编码的P1–P4、P8和P10为结构蛋白, 分别是RNA依赖的RNA聚合酶、病毒核心外壳蛋白、鸟苷酸转移酶、B-突起结构蛋白、病毒核转录调节因子和病毒外壳主要蛋白。编码的P6、P7-1、P7-2、P9-1和P9-2为非结构蛋白(Zhang et al., 2001; Zhou et al., 2008; Wang et al., 2010)。卢嫣红等(2011)对编码蛋白的功能进行了初步研究, 发现P6为多功能蛋白, 具有与RBSDV的P6一样的RNA沉默抑制子作用。此外, P6还在寄主植物细胞内通过自我互作或与P5-1互作或通过招募P9-1的形式参与病毒基质的形成(Li et al., 2013, 2015a)。另外还发现, 在未感染病毒的介体白背飞虱细胞内, P5-1和P9-1也能形成丝状与颗粒状病毒基质(Mao et al., 2013)。以上结果表明, P5-1、P6和P9-1对SRBSDV感染细胞内病毒基质形成和成熟是必需的。有报道显示, P7-1在病毒管状结构形成中起着重要作用, 参与病毒在细胞间的运动和扩散(Liu et al., 2011)。在对病毒与寄主蛋白互作研究中发现, P7-1与至少18个寄主的蛋白互作形成复杂的复合体来参与病毒的扩散(Mar et al., 2014)。SRBSDV的P9-1被证实与RBSDV的P9-1一样是病毒基质组成成分和病毒复制的必要物质(Zhang et al., 2008; Jia et al., 2012a)。最近的研究还发现, P9-1以自我互作的形式参与病毒基质的形成, 其C-端(从氨基酸324–347)在病毒二十面体的形成中发挥非常重要的作用(Li et al., 2015b)。P9-1编码的其它蛋白的功能还有待进一步

研究。

1.3 玉米粗缩病毒分子特征

玉米粗缩病毒是最早发现能引起玉米粗缩病的植物呼肠孤病毒, 在欧洲、中东及北美地区发生并造成危害。虽然MRDV与RBSDV有很近的血清学关系, 但在生物学上存在着非常重要的差异, 如MRDV不能危害水稻, 而RBSDV最初在水稻上发现。此外, 与RBSDV传播方式不同, MRDV通过介体灰飞虱的卵进行传播(Milne and Lovisolo, 1977)。虽然MRDV是最早被发现的, 但其全基因组测序工作于近期完成(Lv et al., 2016)。10条dsRNA片段(S1–S10)基因组全长为29 144 bp, 其分子结构与其它3个引起玉米粗缩病的斐济病毒属第2组的成员RBSDV、SRBSDV和MRCV相似, 含有13个ORFs, S5含有2个部分重叠的ORFs, S7和S9含有2个非重叠的ORFs, 其余7条基因组片段均为单顺反子, 分别只编码1个蛋白(表1)。这13个ORFs的序列与RBSDV相应的序列同源性最高(81%–97%)。S1被预测编码RdRp酶, 其余的基因组片段所编码的蛋白结构和功能还有待研究。

1.4 MRCV病毒分子特征

MRCV病毒在阿根廷、巴西和乌拉圭等南美地区危害玉米, 造成粗缩病。对MRCV的基因组序列分析表明(表1), 在其10条dsRNA片段中, S1是RBSDV病毒S1的同源基因, 编码RdRp酶; S2编码的蛋白为B-突起结构蛋白, 与RBSDV的S4和斐济病病毒(FDV)的S3编码的B-突起结构蛋白具有中等的同源性; S3编码病毒粒子的核心结构蛋白, 但它的核苷酸序列与RBSDV的S2和斐济病病毒(FDV)的S3有较高的同源性, 它们编码病毒核心衣壳蛋白(Distéfano et al., 2003, 2009); MRCV的S4与相应的RBSDV的S4序列一致, 在MRCV的S4两端含有病毒复制和组装的编码序列(Distéfano et al., 2002); MRCV的S5与RBSDV的S5同源性为62.8%, 并且在其C-端含有1个少见的过氧化酶-I型锚定信号, 尚未见S5含有2个部分重叠的ORFs的报道(Distéfano et al., 2005); MRCV的S6编码蛋白与RBSDV的S6编码蛋白同源性较低(Distéfano et al., 2003); MRCV的S7与其它同属病毒的S7一样, 含有2个非重叠的ORFs, 推测分别编码41.5和36.8 kDa的非结构蛋白(Guzmán et al.,

2007); MRCV的S8与相应的RBSDV的S8序列一致(Distéfano et al., 2002); 与其它同属的3个粗缩病毒的S9一样, MRCV的S9含有2个非重叠的ORFs, 推测分别编码39.1和20.5 kDa的非结构蛋白(Guzmán et al., 2007); MRCV的S10编码的蛋白与RBSDV的S10编码的核心外壳蛋白同源率为62.8% (Distéfano et al., 2005)。与同属的RBSDV和MRDV比较, MRCV与RBSDV的同源性比MRDV与RBSDV的同源性低(Distéfano et al., 2002, 2003, 2005; Wang et al., 2003; Guzmán et al., 2007; Lv et al., 2016)。MRCV基因编码蛋白的功能还未进行深入研究。但最近的研究表明, MRCV的S9编码的P9-1蛋白在侵染的细胞内形成细胞质包涵体, 用于病毒基质的组装和病毒复制; 对P9-1的生化特性分析表明, 它与单链RNA结合, 具有ATP酶活性, 并且其C-端在VIB-结构(VIB-like)的形成中起重要作用(Guzmán et al., 2010; Maroniche et al., 2010)。

1.5 玉米粗缩病病毒基因组的变异

近年来, 部分研究者对导致玉米粗缩病的病毒基因组变异和进化机制展开了研究。通过对从不同地理位置(地区)或不同寄主分离出的同一病毒的基因组序列比较及在此基础上构建系统发育树, 研究病毒基因组的变异、进化趋势及影响因素。结果发现, 造成我国玉米粗缩病大发生的RBSDV基因组的变异非常广泛, 基因组的多样性主要是经常发生的基因漂移、重组、重排、负向或纯化选择造成的随机变异的结果, 与地理环境和寄主类型相关性不大(Li et al., 2012; Yin et al., 2013; Zhou et al., 2015a, 2015b)。病毒可能通过基因组变异来适应环境的变化并与寄主一同进化。

2 玉米粗缩病抗性分子遗传研究

近年来, 国内外学者加大了对玉米抗粗缩病的遗传研究力度, 在抗性种质资源收集、鉴定与筛选、抗性遗传规律探索和抗病基因定位等方面取得了较大进展。

2.1 抗病种质资源的筛选和抗性遗传

在抗病种质资源筛选上, 国内学者对大量收集的玉米种质资源及选育的自交系进行了抗性鉴定(郭启唐和李钊敏, 1995; 刘志增等, 1996; 路银贵等, 2001; 陈

永坤等, 2008; 杨兴飞等, 2010; 薛林等, 2011), 发现在我国现有玉米种质中缺乏对粗缩病完全免疫的材料, 但筛选出了少量在不同环境下均表现高抗的种质。结合分子标记对来源不同的种质(自交系)进行抗性遗传多样性分析并在此基础上进行系统分类, 挖掘抗性较好的杂种优势群, 发现高抗的材料主要集中在PB亚群(包括衍生于美国杂交种P78599的自交系)和四平头亚群; 并且发现不同来源的玉米自交系之间的抗性有明显差异, 为抗病品种的选育提供了遗传基础。

在抗性遗传研究上, 最早采用经典的遗传学方法对玉米抗MRCV进行了遗传研究。Di Renzo等(2002)用感粗缩病马齿型的自交系Mo17与抗病硬粒型的自交系BSL14的杂交后代F_{2:3}的227个家系进行了多年多点自然鉴定, 结果表明玉米对MRCV的抗性是受遗传因素和环境因素共同作用的数量性状, 广义遗传力在0.44–0.56之间, 受环境影响明显。而Bonamico等(2012)利用同样2个亲本的杂交后代得到的包含145个株系的重组自交系(RILs)群体对抗性进行了遗传分析, 结果显示其广义遗传力为0.20–0.27, 抗性呈现典型的数量性状特征。山东大学张举仁研究团队利用抗病自交系90110和感病自交系掖478及其F₁、F₂、F₃、BC₁和RIL群体对抗RBSDV的遗传进行了大量的研究, 结果表明抗病性主要由基因型决定, 受环境效应、基因型与环境互作效应的影响较小, 粗缩病抗性的广义遗传力范围为0.71–0.94。在该抗性材料中, 粗缩病的抗性主要是由遗传因素决定的, 符合加性-显性遗传模型, 加性和显性效应均显著, 总体以加性效应为主(张永生, 2005; 王飞, 2007; 栾俊文, 2012)。Shi等(2012)对由自交系X178和B73杂交得到的包含89个株系的RIL群体进行了多年多点的田间自然抗性鉴定和一年人工接种抗性鉴定, 结果表明在该组合中玉米粗缩病抗性符合数量性状特征, 且包含主效QTL, 广义遗传力为0.467–0.472。另外, 刘志增等(1996)及王安东和赵德发(2000)分别对多份玉米自交系进行了抗病鉴定和遗传分析, 认为玉米抗粗缩病性状为数量性状, 微效多基因的加性效应在性状表达中起主导作用, 随着定向轮回选择, 个体中微效抗性基因量值逐步增多, 基因的累加效应也增大, 抗性也随之增强。总之, 利用抗、感病自交系杂交构建杂交、回交后代分离群体进行遗传与QTL位点分析, 表明玉

米对粗缩病的抗性遗传机制极为复杂,由多个基因与环境共同作用控制,在不同的环境中基因的表达模式不同(王安东和赵德发, 2000; 李常保等, 2002; Di Renzo et al., 2002; 张永生, 2005; 王飞, 2007; 栾俊文, 2012; Shi et al., 2012; Tao et al., 2013)。

2.2 玉米抗粗缩病的基因座(QTL)

随着玉米分子生物学与基因组学的快速发展,利用DNA分子标记在分离群体进行连锁分析和利用全基因组关联分析在粗缩病抗性基因座(QTL)定位研究中取得了显著进展。在玉米的每条染色体上都发现了与粗缩病抗性相关的位点,并且不同的材料抗性位点所处的位置不同(表2)。其中也有在不同材料组合中均起作用的位点。例如,位于第8染色体bin 8.03上的1个主效QTL,可解释表型变异率的24.2%–39.3%,且表现为隐性遗传,表明在其它位点或其它抗性材料中也可能存在与抗性相关的显性遗传位点(基因)。迄今为止,用于抗性基因定位分析的材料,其抗原主要来源于美国杂交种P78599 (Shi et al., 2012; Tao et al., 2013; Liu et al., 2014)。

2.2.1 玉米抗MRCV的基因座(QTL)定位

MRCVD主要在阿根廷流行,因此阿根廷对MRCV引起的粗缩病抗性基因座(QTL)研究比较深入。Di Renzo等(2004)以感病的Mo17与抗病的BSL14配组的杂交后代为材料,对MRCV引起的粗缩病抗性基因座(QTL)进行了定位研究,采用227个F_{2:3}家系和180对SSR标记通过复合区间作图方法定位到2个抗性位点,分别位于bin 1.03 (在bnlg1866–phi095标记之间)和bin 8.03/4 (在phi115–umc1741标记之间),两位点可共同解释表型变异的36.2%。进一步用145个F_{2:6}的RILs系在4个不同的地区环境定位到4个与抗性相关的QTLs,可解释表型变异的8%–14%,它们分别位于第1、4和10染色体上(1.01、1.06、4.08和10.02) (Bonamico et al., 2012)。此外,在对RIL群体进行抗性鉴定的基础上将群体材料分为抗、感病2组,采用方差分析法在第1、2、6和8染色体上发现抗、感病2组之间存在明显差异的SSR分子标记(Bonamico et al., 2010)。利用复合区间作图法,用RIL群体在不同的发病区进一步检测与抗性有关的QTL,发现第1、4、6、8和10染色体区段(1.03、1.07、4.03、4.05、

6.02、8.03和10.02)与抗性显著相关,并且这些显著相关区段中的40%与前人发现的位置一致(Di Renzo et al., 2004; Bonamico et al., 2012, 2013)。最近, Rossi等(2015)以感病的Mo17与抗病的LP116杂交后代的208个F_{2:3}家系为材料,在3个不同地区对MRCV引起的粗缩病抗性遗传机制进行研究,结果显示其抗性遗传力中等(在0.33–0.72之间),在第1、6、8和10染色体(1.03、1.07、6.05、8.08和10.06)上发现了能解释抗性表型变异10%的QTLs。Kreff等(2006)利用玉米杂交种DK664的221个F_{2:3}家系连续3年在3个不同地区进行实验,采用56对SSR标记进行抗性相关分析和QTL作图,发现了5个与抗性相关的位点,2个分别位于第1染色体的长臂和短臂(1.02/03和1.07/08),其余3个分别位于第4、8和10染色体上,其中第1和4染色体的QTL与抗性相关性最明显。综上所述,利用具有不同遗传背景的材料、不同作图群体在不同的发病环境下进行抗性基因的定位研究,在第1、2、4、6、8和10染色体上鉴定出多个与抗MRCV相关的QTLs (表2)。

2.2.2 玉米抗RBSDV的基因座(QTL)定位

我国也展开了大量抗粗缩病基因座(QTL)的发掘工作。Wang等(2007)和Luan等(2012)分别以抗病的自交系90110与感病的自交系掖478杂交的F₂、BC₁和RIL群体为材料,在第2、6、7、8和10染色体上分别检测出5个QTL位点(*qMRD2*、*qMRD6*、*qMRD7*、*qMRD8*和*qMRD10*),其中检测出的3个主效抗粗缩病QTLs,分别位于染色体6.02、7.02和8.07,并且*qMRD8*在3个不同环境下均可检测到,可以解释的表型变异为12.0%–28.9%。Shi等(2012)以抗病的X178与感病的B73配组的89个F₈ RIL家系为定位群体,在第8染色体(bin 8.03)上检测到1个在3个不同环境下均存在的主效抗粗缩病QTL,可以解释抗性表型变异的24.6%–37.3%。此外,还在第10染色体上检测到1个抗性QTL,可以解释抗性变异的15.8%。Tao等(2013)对50个杂合自交后代家系(heterogeneous inbred family, HIF)进行了多年多点的抗粗缩病鉴定,鉴定出24个对粗缩病抗性反应一致的杂合自交后代家系,其中9个表现抗病,15个表现感病;采用关联分析法,在第8染色体的bin 8.03区域发现1个主效QTL (*qMrdd1*),可以解释表型变异的24.7%–39.3%,并

表2 玉米中已定位的抗粗缩病QTLs**Table 2** List of mapped QTLs conferring resistance to MRDD (maize rough dwarf disease) in maize

病原物	染色体(bin)	定位方法	标记类型	定位群体	表型解释率(%)	抗原	参考文献
MRCV	1/6/8/10	QTL	SSR	F _{2:3}	10	LP116	Rossi et al., 2015
MRCV	1.03/8.03/8.04	QTL	SSR	F ₃	36.20	BLS14	Di Renzo et al., 2004
MRCV	1/4/10	QTL	SSR	RIL	8–14	BLS14	Bonamico et al., 2012
MRCV	1/4/8/10	QTL	SSR	F _{2:3}	—	DK664	Kreff et al., 2006
MRCV	1/2/6/8	AD/AMOVA	SSR	RIL	—	BLS14	Bonamico et al., 2010
MRCV	1/4/6/8/10	QTL	SSR	RIL	—	BLS14	Bonamico et al., 2013
RBSDV	1/2/5	QTL	SSR	RIL	4.69–17.74	80007	商伟等, 2011
RBSDV	8.03	QTL	SNP/SSR	RIL	24.8–37.3	X178	Shi et al., 2012
RBSDV	8.07	QTL	SSR	F ₂ /BC ₁ /RIL	12.0–28.8	90110	Luan et al., 2012
RBSDV	8.03	QTL	SNP	NIL	24.2–39.3	NT411	Tao et al., 2013
RBSDV	1/2/5/6/7/8	GWAS	SNP	Inbred lines	—	—	Chen et al., 2015
RBSDV	6.02/7.02/8.07	BSA	SSR	F ₂ /BC ₁	—	90110	Wang et al., 2007
RBSDV	1/2/3/4/5/6/7/8/10	GWAS	SNP	Inbred lines	—	78599	Liu et al., 2014
RBSDV	1/2/3/4/5/6/9/10	GWAS	SNP	Inbred lines	—	—	Hao et al., 2015
RBSDV	2	BSA	SSR	F ₂ /BC ₁	—	齐319	何龙等, 2008
RBSDV	5/9	BSA	SSR	F ₂	—	87–1	陈艳萍等, 2008
RBSDV	2/6/7/8/10	QTL	SSR	RIL	12–28.9	90110	栾俊文, 2012
RBSDV	1.07/3.06/6.01/	BSA	SSR	RIL	—	黄早四	陈永坤, 2007
RBSDV	2/3/4/6/7/8/10	QTL	SNP	RIL	—	黄早四	史利玉, 2010

AD/AMOVA: 判别分析/分子变异等级分析; GWAS: 全基因组关联分析; BSA: 分离群体分组分析法; RIL: 重组自交系; NIL: 近等基因系

AD/AMOVA: Discriminant analysis/a molecular analysis of variance; GWAS: Genome-wide association study; BSA: Bulk segregant analysis; RIL: Recombinant inbred lines; NIL: Near isogenic lines

且表现为隐性遗传。

史利玉(2010)利用黄早四与掖107配组构建的RIL群体,在染色体2、3、4、6、7、8和10上均检测到抗性QTL,但效应值较小,通过比较定位分析,发现在第3染色体3.04 (SNP610–SNP1438标记之间)、第4染色体4.03 (SNP1287–SNP581标记之间)、第6染色体6.05 (SNP1518–SNP408标记之间)、第7染色体7.02/03 (SNP637–SNP686标记之间)和第8染色体8.06 (SNP619–SNP68标记之间)上存在粗缩病抗性位点。商伟等(2011)以玉米抗病自交系80007和感病自交系80044为亲本衍生的RIL群体构建连锁图谱,对205个F₅₋₆家系进行粗缩病抗性鉴定和连锁分析,检测到分布在第1、2和5染色体上的5个QTLs,可解释4.69%–17.74%的表型变异,其中定位于第2染色体的QTL在2种环境下均被检测到,分别解释抗性表型变异的17.74%和8.76%。

虽然通过传统的连锁分析方法已成功定位了一些抗性QTLs,但用于构建连锁作图群体的抗原主要衍生于美国杂交种P78599,如齐319和X178等,获

得的抗性QTLs遗传基础较窄,导致等位基因数少,可能只代表玉米对粗缩病抗性的一部分。而全基因组关联分析采用自然群体,具有在不同遗传背景的种质资源中检测与抗性相关所有位点的优势,因此近年来通过全基因组关联分析的方法挖掘抗粗缩病基因研究有了较大进展。Chen等(2015)对收集的527个玉米自交系在4个不同环境下对粗缩病的抗性进行了鉴定,采用覆盖全基因组的556 000个SNP标记进行关联分析,在第1、2、5、6、7和8染色体上(1.02/06/08、5.03/04/07、6.04/6.05、7.04和8.03/08)检测到与粗缩病抗性相关联的15个基因,其中9个基因的同源基因在其它植物中被预测参与了植物的防御系统。Liu等(2014)在对我国236个玉米自交系进行2年粗缩病抗性鉴定的基础上,在覆盖全基因组的SNP标记中选取等位基因频率大于5%的41 101个SNP标记进行全基因组关联分析,发现73个SNPs与粗缩病抗性关联,分布在除第9染色体以外的所有染色体上,其中48个SNPs位于与抗性基因连锁不平衡的区域。对衍生于美国杂交种P78599的5个高抗粗缩病的自交系

进行全基因组SNP分析,检测到9个与粗缩病抗性相关联的区域,其中1个位于bin 8.03的81.57 Mb的片段,含有6个与粗缩病抗性相关联的SNPs,与前人检测到存在抗性主效QTL的区域重合(Shi et al., 2012; Tao et al., 2013)。Hao等(2015)也对184个优异自交系进行了3年抗粗缩病鉴定,采用3 072个SNP标记进行粗缩病抗性的关联分析,在除第7和8染色体外的其它染色体上都发现了与抗粗缩病相关联的SNP标记,特别是第1染色体的bin1.11每年均表现与抗性显著关联。综上所述,在玉米的10条染色体上均发现与RBSDV抗性相关的QTLs。

2.2.3 玉米抗粗缩病候选基因的筛选

为了进一步探明引起粗缩病抗性差异的原因,研究者在全基因组关联分析的基础上,在显著关联的区域筛选鉴定出与抗性相关的候选基因。研究表明,这些候选基因编码的蛋白部分与植物的防御系统有关,如抗冻蛋白、赖氨酸脱甲基酶、乙烯响应转录因子、磷脂酰肌醇激酶、 β -葡萄糖苷酶和MLO-like蛋白(Chen et al., 2015)。另外,由基因的功能注释可知,有的候选基因编码的蛋白可能参与转录、蛋白质降解和信号转导等生物过程。例如,编码的蛋白具有核苷磷酸化酶活性的候选基因有GRMZM2G059365、GRMZM2G-819464、GRMZM2G341732、GRMZM5G830839、GRMZM2G405760和GRMZM2G334899;具有核酸(DNA和RNA)结合特性的基因有GRMZM2G013794、GRMZM2G175480、GRMZM2G052926、GRMZM2G160279、GRMZM2G310674和GRMZM2G0-52606;还有的编码转录因子、有催化活性的酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、泛素-蛋白连接酶、水解酶、锌离子结合蛋白和蛋白激酶(Liu et al., 2014)。最新的研究表明,蛋白激酶在识别病原和响应复杂信号的转导过程中起着核心作用,在绝大多数植物R基因(抗性基因)的核酸结合区域都含有3个与ATP/GTP结合蛋白互作的结构域(Song et al., 2015)。在与粗缩病抗性显著关联的区域bin1.11,候选基因GRMZM2G-417217编码类似核RNA输出蛋白,参与调控核内合成的RNA释放到细胞质,在植物对生物和非生物胁迫响应中起着非常重要的作用(Hao et al., 2015)。在被粗缩病毒侵染的玉米植株中,许多蛋白的泛素化途径相关基因的表达发生了显著变化(Zhou et al.,

2016),这些基因也可作为抗粗缩病候选基因。

2.3 玉米粗缩病毒致病机理和玉米抗粗缩病机理

虽然当前对玉米粗缩病毒的分子结构和玉米抗性基因座(QTL)进行了大量的研究与挖掘,但对玉米粗缩病毒的致病机理及玉米抗病机理的研究还不够深入。由于玉米对粗缩病的抗性受微效多基因控制,尽管已确定了1个主效抗病位点且表现为隐性遗传,但至今仍未有克隆到抗性基因。

粗缩病毒通过细胞外壁的伤口或昆虫介体刺吸造成的微伤进入玉米细胞后,脱壳释放核酸,利用寄主细胞内核酸复制机制进行复制、转录和表达,并借助胞间连丝扩散到其它细胞,引起寄主防御系统中相关基因表达、蛋白质合成、激素水平及生物途径的变化,使玉米生长受阻,发育不良,最终导致发病甚至死亡(梁琼等, 2003; Liu et al., 2007a; 黄强, 2010; 张爱红等, 2012; Jia et al., 2012b; 胡帆等, 2013)。研究表明, RBSDV侵染玉米并大量复制后,表达的P7-1参与病毒管状结构的形成和在寄主细胞间的移动,致使病毒扩散(Isogai et al., 1998; 钟永旺等, 2003),而S8编码的衣壳蛋白P8进入玉米的细胞核内作为基因转录抑制因子抑制其核酸的转录(Liu et al., 2007a)。Jia等(2012b)用含有43 803个寡聚核苷酸探针的芯片对玉米粗缩病抗性基因的差异表达进行了研究,发现玉米被粗缩病毒侵染后,多数与细胞壁相关的基因表达受到抑制,许多激素基因及其相关的基因表达量变化显著,包括生长素家族基因、生长素反应因子、开花时间相关基因和花发育相关基因,这些基因表达量的变化直接影响玉米植株的发育。

为了进一步阐明玉米抗粗缩病机理,研究者采用芯片技术和高通量测序技术分别对水稻与玉米小RNA(miRNA)及其靶基因对粗缩病毒(RBSDV和SRBSDV)的应答通路进行了研究(Xu et al., 2014; Sun et al., 2015; Zhou et al., 2016)。结果显示,一些miRNA家族及其靶基因对病毒有应答,在玉米与病毒互作中起着重要作用(Zhou et al., 2016)。例如,与细胞壁结构有关的纤维素酶(CESA3和GRMZM2G025231)和类纤维素酶(CSLF6、GRMZM2G1222-77和GRMZM2G110145)基因的表达量减少可能与粗缩病植株矮缩有关;与泛素有关的基因(如miR16-9i-p5的靶基因GRMZM2G087312、GRMZM2G09-

4595和GRMZM2G012690)的表达受到抑制, 泛素合成途径相关基因(GRMZM2G046848、GRMZM2G14-4782和GRMZM2G303964)的表达也发生了变化。结合以前发现的RBSDV病毒的P7-2与泛素连接酶E3的核心亚基SKP1互作调控泛素途径(Wang et al., 2013), 进一步证实泛素途径在玉米抗粗缩病中起着非常重要的作用, 因此与之相关的基因可作为抗性候选基因进一步研究。此外, 研究者还发现玉米叶绿体相关基因和光合色素合成相关基因(GRMZM2G03-1169、GRMZM2G046163、GRMZM2G015892和GRMZM2G097457)的表达也受到影响, 这可能是造成病株叶色深绿和粗糙病症的原因(Zhou et al., 2016)。

玉米与其它植物一样, 为了抵制外来病原体(如病毒分子)的入侵, 进化出大量的抗性R基因, 其表达产物可直接引发抗病反应或编码与抗性相关的酶, 如受体蛋白激酶(Song et al., 2015)。由于R蛋白分子具有可识别病毒外壳蛋白的结构域, 因此将病毒外壳蛋白基因导入玉米中可诱发植株的抗病性(Caplan and Dinesh-Kumar, 2006)。今后可利用基因工程如转基因技术、RNA沉默和基因敲除的方法, 加强对玉米抗粗缩病毒机理的研究, 进而获得新的抗病材料。

3 结束语

引起玉米粗缩病的4种斐济病毒的基因组组成目前已清楚, 其基因表达产物和编码蛋白的生物学功能有待进一步研究。虽然已对玉米抗粗缩病的功能基因座(QTL)进行了大量的研究和发掘, 但因致病病原不同和抗性基因的来源不同, 迄今仅发现1个在不同的遗传背景下均起作用的主效抗病位点bin 8.03, 且表现为隐性遗传, 此抗性基因仍待克隆和功能分析。利用QTL定位、全基因组关联分析、芯片和高通量测序技术等已初步筛选出一些与抗性相关的候选基因和miRNA及其靶基因。进一步对其进行功能验证将有助于我们对粗缩病抗性机理的研究和玉米抗粗缩病种质的改良。

参考文献

安德荣, 慕小倩 (1996). 禾谷类三种主要病毒病的电镜观察. 西北植物学报 16, 251-254.

- 陈艳萍, 孟庆长, 袁建华 (2008). 利用SSR-BSA技术筛选玉米粗缩病抗性基因分子标记. 江苏农业学报 24, 590-594.
- 陈永坤 (2007). 玉米抗粗缩病种质鉴定与基因定位初步研究. 博士论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学. pp. 37-54.
- 陈永坤, 李新海, 肖木辑, 李明顺, 苑森行, 王向东, 张世煌 (2008). 64份玉米自交系抗粗缩病的遗传变异分析. 作物学报 32, 1848-1854.
- 方守国, 于嘉林, 冯继东, 吴大椿, 李大伟, 韩成贵, 刘仪 (2001). 水稻黑条矮缩病毒基因组片段3全长cDNA的克隆及其序列分析. 农业生物技术学报 9, 311-315.
- 郭启唐, 李钊敏 (1995). 玉米粗缩病及自交系抗病性观察与分析. 植物保护 21, 21-23.
- 何龙, 王伯初, 吴红, 雷开荣 (2008). 玉米粗缩病抗性基因SSR标记初步研究. 广东农业科学 8, 5-8.
- 胡帆, 雷荣, 廖晓兰 (2013). 植物病毒在细胞间转运的机理探讨. 生物学杂志 30, 81-85.
- 黄强 (2010). 玉米粗缩病症与内源激素水平变化的关系研究. 硕士论文. 成都: 四川农业大学. pp. 35-40.
- 李常保, 宋建成, 姜丽君, 杨春英, 王启柏, 王守义 (2002). 玉米抗粗缩病病毒(MRDV)基因的RAPD标记及其辅助选择效果研究. 作物学报 29, 564-568.
- 梁琼, 燕永亮, 侯明生 (2003). 不同玉米品种抗感MRDV与防御酶活性的关系. 华中农业大学学报 22, 114-116.
- 刘志增, 池书敏, 宋占权, 陈景堂, 孟义江 (1996). 玉米自交系及杂交种抗粗缩病性鉴定与分析. 玉米科学 4, 68-70.
- 卢嫣红, 张金凤, 熊如意, 徐秋芳, 周益军 (2011). 南方水稻黑条矮缩病毒S6编码一个沉默抑制子. 中国农业科学 44, 2909-2917.
- 路银贵, 邸垫平, 苗洪芹, 田兰芝 (2001). 国外及国内玉米自交系抗粗缩病性鉴定及分析. 河北农业科学 5, 22-25.
- 栾俊文 (2012). 玉米粗缩病相关性状的遗传学分析和QTL定位. 博士论文. 济南: 山东大学. pp. 42-66.
- 商伟, 张彦军, 魏海忠, 孔晓民, 蒋飞, 刘保申 (2011). 玉米SSR连锁图谱构建和粗缩病抗性QTL的初步定位. 山东农业科学 12, 1-6.
- 史利玉 (2010). 玉米粗缩病抗性遗传研究. 博士论文. 成都: 四川农业大学. pp. 56-83.
- 王安东, 赵德发 (2000). 玉米自交系抗粗缩病特性的遗传基础及轮回选择效应研究. 玉米科学 8, 80-82.
- 王飞 (2007). 玉米粗缩病抗病位点的分子标记定位. 博士论文. 济南: 山东大学. pp. 82-99.
- 薛林, 张丹, 徐亮, 金萌萌, 彭长俊, 徐辰武 (2011). 玉米抗

- 粗缩病自交系种质的发掘和遗传多样性及其在育种中的应用. 作物学报 **37**, 2123–2129.
- 羊健 (2014). 水稻黑条矮缩病毒基因组S5的编码方式及其编码蛋白的功能研究. 博士论文. 长沙: 湖南农业大学. pp. 37–63.
- 杨兴飞, 温广波, 杨铁 (2010). 玉米不同种质对粗缩病的抗性鉴定和分析. 玉米科学 **18**, 144–146.
- 张爱红, 任萍, 邸垫平, 苗洪芹, 曹克强 (2012). RBSDV所致玉米粗缩病不同病级植株内源激素水平变化研究. 华北农学报 **26**, 217–220.
- 张恒木 (2001). 水稻黑条矮缩病毒分子生物学. 博士论文. 杭州: 浙江大学. pp. 66–128.
- 张恒木, 陈剑平, 雷娟丽, 程晔, 薛庆中 (2002). 水稻黑条矮缩病毒基因组片段S7的cDNA克隆及全序列分析. 微生物学报 **42**, 200–207.
- 张恒木, 雷娟利, 陈剑平 (2001). 浙江和河北发生的一种水稻、小麦、玉米矮缩病是水稻黑条矮缩病毒引起的. 中国病毒学 **16**, 246–251.
- 张永生 (2005). 玉米遗传图谱构建和花粉管通道法转化玉米的研究. 博士论文. 济南: 山东大学. pp. 63–76.
- 钟永旺, 周洁, 庄斌全, 魏春红, 李毅 (2003). 水稻黑条矮缩病毒第七号片段的cDNA克隆及其在大肠杆菌中的表达. 微生物学报 **43**, 442–447.
- Ali FH, Yan JB (2012). Disease resistance in maize and the role of molecular breeding in defending against global threat. *J Integr Plant Biol* **54**, 134–151.
- Bonamico NC, Balzarini MG, Arroyo AT, Ibañez MA, Díaz DG, Salerno JC, Di Renzo MA (2010). Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. *Phyton-Revista Int Bot Exp* **79**, 31–38.
- Bonamico NC, Di Renzo MA, Borghi M, Ibanez MA, Díaz DG, Balzarini MG (2013). Mapping QTL for a multivariate measure of the reaction with the Mal de Río Cuarto virus. *J Basic Appl Genet* **24**, 11–21.
- Bonamico NC, Di Renzo MA, Ibañez MA, Borghi M, Díaz DG, Salerno JC, Balzarini MG (2012). QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *J Agri Sci* **150**, 619–629.
- Caplan J, Dinesh-Kumar SP (2006). Recognition and signal transduction associated with *R* gene-mediated resistance, natural resistance mechanisms of plants to viruses. In: Loebenstein G, Carr JP, eds. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Berlin: Springer. pp. 73–98.
- Chen GS, Wang XM, Hao JJ, Yan JB, Ding JQ (2015). Genome-wide association implicates candidate genes conferring resistance to maize rough dwarf disease in maize. *PLoS One* **10**, e0142001.
- Cheng ZB, Li S, Gao RZ, Sun F, Liu WC, Zhou GH, Wu JX, Zhou XP, Zhou YJ (2013). Distribution and genetic diversity of Southern rice black-streaked dwarf virus in China. *Virology* **10**, 307.
- Di Renzo MA, Bonamico NC, Díaz DD, Ibañez MM, Faricelli ME, Balzarini MG, Salerno JC (2004). Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. *J Agri Sci* **142**, 289–295.
- Di Renzo MA, Bonamico NC, Díaz DD, Salerno JC, Ibañez MM, Gesumaria JJ (2002). Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). *J Agri Sci* **139**, 47–53.
- Distéfano AJ, Conci LR, Hidalgo MM, Guzmán FA, Hopp HE, del Vas M (2002). Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species. *Arch Virol* **147**, 1699–1709.
- Distéfano AJ, Conci LR, Hidalgo MM, Guzmán FA, Hopp HE, del Vas M (2003). Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of Mal de Río Cuarto virus, a newly accepted *Fijivirus* species. *Virus Res* **92**, 113–121.
- Distéfano AJ, Hopp HE, Del Vas M (2005). Sequence analysis of genome segments S5 and S10 of Mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus*, Reoviridae). *Arch Virol* **150**, 1241–1248.
- Distéfano AJ, Maldonado S, Hopp HE, del Vas M (2009). Mal de Río Cuarto virus (MRCV) genomic segment S3 codes for the major core capsid protein. *Virus Genes* **38**, 455–460.
- Fang S, Yu J, Feng J, Han C, Li D, Liu Y (2001). Identification of rice black-streaked dwarf fijivirus in maize with rough dwarf disease in China. *Arch Virol* **146**, 167–170.
- Guzmán FA, Arneodo JD, Saavedra Pons AB, Truol GA, Luque AV, Conci LR (2010). Immunodetection and subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus P9-1 protein in infected plant and insect host cells. *Virus Genes* **41**, 111–117.
- Guzmán FA, Distéfano AJ, Arneodo JD, Hopp HE, Lenardon SL, Del Vas M, Conci LR (2007). Sequencing of the bicistronic genome segments S7 and S9 of Mal de

- Río Cuarto virus (*Fijivirus*, Reoviridae) completes the genome of this virus. *Arch Virol* **152**, 565–573.
- Hao DR, Cheng YJ, Chen GQ, Lu HH, Shi ML, Zhang ZL, Huang XL, Mao YX, Xue L (2015). Identification of significant single nucleotide polymorphisms for resistance to maize rough dwarf disease in elite maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Euphytica* **203**, 109–120.
- Isogai M, Uyeda I, Lee BC (1998). Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J Gen Virol* **79**, 1487–1494.
- Jia DS, Chen HY, Zheng AL, Chen Q, Liu QF, Xie LH, Wu ZJ, Wei TY (2012a). Development of an insect vector cell culture and RNA interference system to investigate the functional role of fijivirus replication protein. *J Virol* **86**, 5800–5807.
- Jia MA, Li YQ, Lei L, Di DP, Miao HQ, Fan ZF (2012b). Alteration of gene expression profile in maize infected with a double-stranded RNA fijivirus associated with symptom development. *Mol Plant Pathol* **13**, 251–262.
- Kreff E, Pacheco MG, Díaz D, Robredo C, Puecher D, Céliz A, Salerno JC (2006). Resistance to Mal de Río Cuarto virus in maize: a QTL mapping analysis. *J Basic Appl Genet* **17**, 41–50.
- Li J, Xue J, Zhang HM, Yang J, Lv MF, Xie L, Meng Y, Li PP, Chen JP (2013). Interactions between the P6 and P5-1 proteins of southern rice black-streaked dwarf fijivirus in yeast and plant cells. *Arch Virol* **158**, 1649–1659.
- Li J, Xue J, Zhang HM, Yang J, Xie L, Chen JP (2015a). Characterization of homologous and heterologous interactions between viroplasm proteins P6 and P9-1 of the fijivirus southern rice black-streaked dwarf virus. *Arch Virol* **160**, 453–457.
- Li XY, Zhang WY, Ding Y, Wang ZC, Wu ZX, Yu L, Hu DY, Li P, Song BS (2015b). Characterization of the importance of terminal residues for southern rice black-streaked dwarf virus P9-1 viroplasm formations. *Protein Express Purif* **111**, 98–104.
- Li YQ, Jia MG, Jiang ZD, Zhou T, Fan ZF (2012). Molecular variation and recombination in RNA segment 10 of rice black-streaked dwarf virus isolated from China during 2007–2010. *Arch Virol* **157**, 1351–1356.
- Liu CL, Weng JF, Zhang DG, Zhang XC, Yang XY, Shi LY, Meng Q, Yuan JH, Guo XP, Hao ZF (2014). Genome-wide association study of resistance to rough dwarf disease in maize. *Eur J Plant Pathol* **139**, 205–216.
- Liu HJ, Wei CH, Zhong YW, Li Y (2007a). Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts. *FEBS Lett* **581**, 2534–2540.
- Liu HJ, Wei CH, Zhong YW, Li Y (2007b). Rice black-streaked dwarf virus outer capsid protein P10 has self-interactions and forms oligomeric complexes in solution. *Virus Res* **127**, 34–42.
- Liu XY, Yang J, Xie L, Li J, Song XJ, Chen JP, Zhang HM (2015). P5-2 of rice black-streaked dwarf virus is a non-structural protein targeted to chloroplasts. *Arch Virol* **160**, 1211–1217.
- Liu Y, Jia DS, Chen HY, Chen Q, Xie LH, Wu ZJ, Wei TY (2011). The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. *Arch Virol* **156**, 1729–1736.
- Luan JW, Wang F, Li YJ, Zhang B, Zhang JR (2012). Mapping quantitative trait loci conferring resistance to rice black-streaked virus in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* **125**, 781–791.
- Lv M, Xie L, Yang J, Chen J, Zhang HM (2016). Complete genomic sequence of maize rough dwarf virus, a fijivirus transmitted by the small brown planthopper. *Genome A* **4**, e01529–e01515.
- Mao QZ, Zheng SL, Han QM, Chen HY, Ma YY, Jia DS, Chen Q, Wei TY (2013). New model for the genesis and maturation of viroplasms induced by fijiviruses in insect vector cells. *J Virol* **87**, 6819–6828.
- Mar TT, Liu WW, Wang XF (2014). Proteomic analysis of interaction between P7-1 of Southern rice black-streaked dwarf virus and the insect vector reveals diverse insect proteins involved in successful transmission. *J Proteomics* **102**, 83–97.
- Maroniche GA, Mongelli VC, Peralta AV, Distéfano AJ, Llauger GL, Taboga OA, Hopp EH, del Vas M (2010). Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus*, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *Virus Res* **152**, 96–103.
- Milne RG, Conti M, Lisa V (1973). Partial purification, structure and infectivity of complete maize rough dwarf virus particles. *Virology* **53**, 130–141.
- Milne RG, Lovisolo O (1977). Maize rough dwarf and related viruses. *Adv Virus Res* **21**, 267–341.
- Nakashima N, Koizumi M, Watanabe H, Noda H (1996). Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: a putative member of the genus *Fijivirus*. *J Gen Virol* **77**, 139–146.

- Rossi EA, Borghi ML, Renzo MAD, Bonamico NC** (2015). Quantitative trait loci (QTL) identification for resistance to Mal de Río Cuarto Virus (MRCV) in maize based on segregate population. *Open Agri J* **9**, 55.
- Shi LY, Hao ZF, Weng JF, Xie CX, Liu CL, Zhang DG, Li MS, Bai L, Li XH, Zhang SH** (2012). Identification of a major quantitative trait locus for resistance to maize rough dwarf virus in a Chinese maize inbred line X178 using a linkage map based on 514 gene-derived single nucleotide polymorphisms. *Mol Breed* **30**, 615–625.
- Song W, Wang BQ, Li XH, Wei JF, Chen L, Zhang DM, Zhang WY, Li RG** (2015). Identification of immune related LRR-containing genes in maize (*Zea mays* L.) by genome-wide sequence analysis. *Int J Genomics* **2015**, 231358.
- Sun ZT, He YQ, Li JM, Wang X, Chen JP** (2015). Genome-wide characterization of *rice black streaked dwarf virus*-responsive microRNAs in rice leaves and roots by small RNA and degradome sequencing. *Plant Cell Physiol* **56**, 688–699.
- Supyani S, Hillman BI, Suzuki N** (2007). Baculovirus expression of the 11 mycoreovirus-1 genome segments and identification of the guanylyltransferase-encoding segment. *J Gen Virol* **88**, 342–350.
- Tao YF, Liu QC, Wang HH, Zhang YJ, Huang XY, Wang BB, Lai JS, Ye JR, Liu BS, Xu ML** (2013). Identification and fine-mapping of a QTL, *qMrdd1*, that confers recessive resistance to maize rough dwarf disease. *BMC Plant Biol* **13**, 145.
- Wang F, Zhang YS, Zhuang YL, Qin GZ, Zhang JR** (2007). Molecular mapping of three loci conferring resistance to maize rough dwarf disease. *Mol Plant Breed* **5**, 178–179.
- Wang Q, Tao T, Han YH, Chen XR, Fan ZF, Li DW, Yu JL, Han CG** (2013). Nonstructural protein P7-2 encoded by rice black-streaked dwarf virus interacts with SKP1, a core subunit of SCF ubiquitin ligase. *Virol J* **10**, 325.
- Wang Q, Tao T, Zhang YJ, Wu WQ, Li DW, Yu JL, Han CG** (2011). Rice black-streaked dwarf virus P6 self-interacts to form punctate, viroplasm-like structures in the cytoplasm and recruits viroplasm-associated protein P9-1. *Virol J* **8**, 24.
- Wang Q, Yang J, Zhou GH, Zhang HM, Chen JP, Adams MJ** (2010). The complete genome sequence of two isolates of southern rice black-streaked dwarf virus, a new member of the genus *Fijivirus*. *J Phytopathol* **158**, 733–737.
- Wang ZH, Fang SG, Xu JL, Sun LY, Li DW, Yu JL** (2003). Sequence analysis of the complete genome of rice black-streaked dwarf virus isolated from maize with rough dwarf disease. *Virus Genes* **27**, 163–168.
- Wu JY, Li J, Mao X, Wang WW, Cheng ZB, Zhou YJ, Zhou XP, Tao XR** (2013). Viroplasm protein P9-1 of rice black-streaked dwarf virus preferentially binds to single-stranded RNA in its octamer form, and the central interior structure formed by this octamer constitutes the major RNA binding site. *J Virol* **87**, 12885–12899.
- Xu DL, Mou GP, Wang K, Zhou GH** (2014). MicroRNAs responding to southern rice black-streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom development in rice. *Virus Res* **190**, 60–68.
- Xu QF, Ni HP, Zhang JF, Lan Y, Ren CM, Zhou YJ** (2015). Whole-genome expression analysis of rice black-streaked dwarf virus in different plant hosts and small brown planthopper. *Gene* **572**, 169–174.
- Yang J, Zhang HM, Ying L, Li J, Lv MF, Xie L, Li PP, Liu XY, Dai LY, Chen JP** (2014). Rice black-streaked dwarf virus genome segment S5 is a bicistronic mRNA in infected plants. *Arch Virol* **159**, 307–314.
- Yin X, Xu FF, Zheng FQ, Li XD, Liu BS, Zhang CQ** (2011). Molecular characterization of segments S7 to S10 of a southern rice black-streaked dwarf virus isolate from maize in northern China. *Virol Sin* **26**, 47–53.
- Yin X, Zheng FQ, Tang W, Zhu QQ, Li XD, Zhang GM, Liu HT, Liu BS** (2013). Genetic structure of rice black-streaked dwarf virus populations in China. *Arch Virol* **158**, 2505–2515.
- Zambrano JL, Jones MW, Brenner E, Francis DM, Tomas A, Redinbaugh MG** (2014). Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theor Appl Genet* **127**, 867–880.
- Zhang CZ, Liu YY, Liu LY, Lou ZY, Zhang HY, Miao HQ, Hu XB, Pang YP, Qiu BS** (2008). Rice black streaked dwarf virus P9-1, an α -helical protein, self-interacts and forms viroplasms *in vivo*. *J Gen Virol* **89**, 1770–1776.
- Zhang HM, Chen J, Adams M** (2001). Molecular characterisation of segments 1 to 6 of rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome. *Arch Virol* **146**, 2331–2339.
- Zhang LD, Wang ZH, Wang XB, Li DW, Han CG, Zhai YF, Yu JL** (2005). Two virus-encoded RNA silencing suppressors, P14 of beet necrotic yellow vein virus and S6 of rice black streak dwarf virus. *Chin Sci Bull* **50**, 305–310.
- Zhou GH, Wen JJ, Cai DJ, Li P, Xu DL, Zhang SG** (2008). Southern rice black-streaked dwarf virus: a new proposed *Fijivirus* species in the family Reoviridae. *Chin Sci Bull* **53**,

3677–3685.

Zhou GH, Xu DL, Xu DG, Zhang MX (2013). Southern rice black-streaked dwarf virus: a white-backed planthopper-transmitted *fijivirus* threatening rice production in Asia. *Front Microbiol* **4**, 270.

Zhou Y, Weng JF, Chen YP, Liu CL, Han XH, Hao ZF, Li MS, Yong HJ, Zhang DG, Zhang SH (2015a). Phylogenetic and recombination analysis of rice black-streaked dwarf virus segment 9 in China. *Arch Virol* **160**, 1119–1123.

Zhou Y, Weng JF, Chen YP, Wu JR, Meng QC, Han XH, Hao ZF, Li MS, Yong HJ, Zhang DG (2015b). Molecular genetic analysis and evolution of segment 7 in rice black-streaked dwarf virus in China. *PLoS One* **10**, e0131410.

Zhou Y, Xu ZN, Duan CX, Chen YP, Meng QC, Wu JR, Hao ZF, Wang ZH, Li MS, Yong HJ, Zhang DG, Zhang SH, Weng JF, Li XH (2016). Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to rice black-streaked dwarf virus in maize. *J Exp Bot* **67**, 4593–4609.

Molecular Study on Maize Rough Dwarf Disease: A Review

Ronggai Li^{1*}, Yanmei Lu¹, Yueying Wang², Baoqiang Wang¹, Wei Song¹, Wenying Zhang¹

¹Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hebei Province, Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035, China; ²College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China

Abstract Maize rough dwarf disease (MRDD) is a worldwide viral disease that causes significant economic losses. Previous studies showed that 4 virus species within the genus *Fijivirus*, family Reoviruses cause maize rough dwarf disease: maize rough dwarf virus, Mal de Río Cuarto virus, rice black-streaked dwarf virus and southern rice black streaked dwarf virus. They are classified as *Fijivirus* group 2, sharing similar biological and genomic characteristics. And all of them contain 10 linear genomic segments of double-stranded RNA (dsRNA) that encode 13 proteins. The whole-genome sequences of the 4 viruses have been published and the functional genes were predicted. The functions of genes were preliminary studied. The completely immune germplasm has not been found; however, a small number of highly resistant germplasm have been identified in different environments. The resistance to MRDD is polygenically inherited and some major and minor quantitative trait loci (QTLs) have been identified. Each chromosome likely contains genes or QTLs for resistance to MRDD. The patterns of cellular defense system-related gene transcription, protein synthesis, hormone level and other biological pathways changed in response to virus infection. We summarize recent molecular studies on the maize rough dwarf disease pathogen, the genetic basis of resistance germplasm and the induced (anti-) mechanism of MRDD to provide theoretical guidance for anti-MRDD molecular breeding.

Key words gene, maize, rough dwarf virus, pathogenesis, resistance mechanism

Li RG, Lu YM, Wang YY, Wang BQ, Song W, Zhang WY (2017). Molecular study on maize rough dwarf disease: a review. *Chin Bull Bot* **52**, 375–387.

* Author for correspondence. E-mail: lironggai@hotmail.com