

分类号 S443
密 级: 无

单位代码: 10335
学 号: 21516153

浙江大学

硕士学位论文



黑尾叶蝉体内两种新型 RNA 病毒的分布研究

**Distribution analysis of two novel RNA virus in the green
rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler)**

申请人姓名: 李晶晶

指导教师: 姚洪渭 副教授

叶恭银 教授

专业名称: 农业昆虫与害虫防治

研究方向: 昆虫生理生化与分子生物学

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二零一八年六月

黑尾叶蝉体内两种新 RNA 病毒的分布特征研究



论文作者签名：_____

指导教师签名：_____

论文评阅人： 双向隐名评阅 _____

答辩委员会主席： 刘同先 教授 西北农林科技大学

委员： 杨 青 教授 大连理工大学

李 胜 教授 华南师范大学

陈 斌 教授 重庆师范大学

徐红星 研究员 浙江省农业科学院

答辩日期： 二〇一八年六月八日 _____

Study on Distribution Characteristics of Two Novel RNA Viruses in the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Hemiptera: Cicadellidae)



Author signature: Jingjing Li

Supervisor signature: Hongwei Yao

Gongyin Ye

Thesis Reviewers: Anonymous

Defence committee:

Chairman: Prof. Tongxian Liu
Northwest Agriculture and Forestry University

Members:	Prof. Qing Yang <i>Dalian University of Technology</i>
-----------------	---

Prof. Sheng Li
South China Normal University

Prof. Bin Chen
Chongqing Normal University

Prof. Hongxing Xu
Zhejiang Academy of Agricultural Sciences

Date of Defence: 8 June, 2018

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得浙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江大学有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 导师签名：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

本研究承蒙

国家重点基础研究计划（973 计划）

(2014CB138404)

资助

致谢

时光不再，光阴似箭，转眼间在美丽的浙江大学已经度过了三个春秋，研究生的这三年，有对科学高峰的彷徨，也有对科研方向的迷茫，但得益于导师的指引，老师们的关怀以及实验室同胞们的帮助，我才能勇登高峰，奋力进步。

首先，衷心地感谢我的导师姚洪渭老师，是他对专业的孜孜以求和精益求精影响了我对科研的态度；是他耐心的指引和确切的明示为我指正了科研的方向；是他的传道授业和呕心沥血开阔了我对科研的学问眼界。

同时也要感谢课题组负责人叶恭银老师对我的鼓励和支持，叶老师对科研的严谨和上下求索的态度时刻鞭策着我在科研道路上不断提升自身的学术精神。叶老师不仅在学术科研上对我们严格要求，在生活中也教育我们用正确乐观的态度去为人处事，给予我们无微不至的关怀。

还要感谢课题组的方琦老师、黄佳老师、汪芳老师、王飞博士后、徐刚博士后、严志超博士后、滕子文博士后在实验上的指导以及生活上的帮助。也非常感谢实验室各位师兄师姐师弟师妹的支持与帮助。要特别感谢贾文茜师姐三年来在实验上的指导和生活上的支持；感谢已经毕业的师兄师姐，包括齐易香、王前进、杜玉萍、陈利鹏、宁铎、武亚苏、阿力、方绍亮、黄天宇、陈晓昂、李萌琪；感谢在读的各位师兄师姐，包括杨蕾、肖山、党聪、王蓓蓓；还有在读的各位同学，包括王嘉乐、毛芬、顾桂香、常学飞、王龙、杨磊、熊时姣、张佼、梅耀天、刘明明、孙初一、倪旭阳、金妙、俞凯丽、钟馥骏、吴慧子、郭磊、杨义。其中要特别感谢王龙在这三年来的照顾与帮助，他在实验上与生活中都给予了我最大的支持。感谢昆虫所其他老师和学生的帮助。

在此，还要感谢父母以及亲人这么多年来支持与鼓励，是他们的奉献才成就了如今的我。

最后要感谢所有关心、支持以及帮助我的人。

李晶晶

2018年6月1日启真湖畔

前言

病毒是一类已知最小的专性活细胞内寄生的微生物，广泛存在于自然界中，寄主范围涵盖动物、植物、真菌和细菌等所有细胞生物（Krupovic 和 Bamford, 2008; Ghabrial 等, 2015）。人类真正认识病毒不过百余年历史，从原先的病症判别、叠层滤纸分离、血清学检验和电子显微镜观察，到如今的核酸/蛋白序列分析，越来越多的病毒种类被不断发现和鉴定（Condit, 2013）。根据国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV）2017 年发布的第十次报告及其网站（<https://talk.ictvonline.org/>）公布数据统计，目前已知病毒/类病毒至少涉及 9 目 131 科 5,268 种，其中感染昆虫等无脊椎动物的至少有 24 科（Maciel-Vergara 和 Ros, 2017; Ryabov, 2017; Williams 等, 2017）。通过宏转录组测序，在超过 220 种无脊椎动物样品中就发现 1,445 种新 RNA 病毒（Shi 等, 2016）。这些病毒不仅在无脊椎动物中普遍存在，极具遗传多样性，而且与其寄主形成复杂的互作关系，具有频繁的寄主转换和共进化等特征。

昆虫是病毒传播的主要媒介，目前至少已知有 13 目 1,600 多种昆虫能被病毒感染（吕鸿声, 1998）。昆虫不仅是病原性病毒的感病寄主，而且还是植物和人畜等病毒病的中间宿主。黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 属半翅目 Hemiptera 叶蝉科 Cicadellidae, 不仅能通过吸汁直接为害水稻，而且作为媒介还能传播多种水稻病毒病如普通矮缩病（Rice dwarf disease）、黄矮病（Rice yellow stunt disease）和黄萎病（Rice yellow dwarf disease）等，给水稻生产带来严重威胁。其中，普通矮缩病毒（Rice dwarf virus, RDV）是水稻普通矮缩病的病原，属于呼肠孤病毒科 Reoviridae 植物呼肠孤病毒属 Phytoreovirus, 为双链 RNA 病毒（Suzuki, 1989），于 1989 年在日本发现（Lowell et al., 1989）。RDV 可以在其寄主黑尾叶蝉体内进行复制与增殖，并通过叶蝉取食感病水稻后，再取食

健康水稻进行交互传播。病毒在叶蝉和植物中均能增殖，分布无组织局限性。两者相互作用引起的水稻矮缩病病害，可以造成被感染水稻的大面积减产，对水稻生产造成严重的损失。

为了探明黑尾叶蝉对 RDV 的传播机制以及两者的互作关系以有效防控叶蝉暴发和水稻矮缩病流行，所在实验室在比较研究携带 RDV 病毒和未携带 RDV 病毒的黑尾叶蝉唾液腺转录组差异时，发现存在两种新 RNA 病毒，而这些新发现的 RNA 病毒的分类地位、与黑尾叶蝉以及 RDV 之间的关系至今尚不清楚。为此，本论文就两种新 RNA 病毒的基因组结构及其系统发育关系、在黑尾叶蝉体内的时空分布和不同地区种群中的分布、以及其与 RDV 的互作关系作了初步研究，旨在为深入理解不同 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内的互作机制、并用以开发叶蝉及其传播病毒病的新防治技术与策略提供基础。

中文摘要

黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* (Uhler) 是水稻矮缩病毒 (Rice Dwarf Virus, RDV) 的重要传播媒介。为了研究 RDV 与黑尾叶蝉之间的互作关系, 对黑尾叶蝉唾液腺进行了转录组测序, 并在其中发现了 2 种新 RNA 病毒。本论文就这 2 种病毒的基因组结构特性和系统发育地位、在黑尾叶蝉体内以及全国稻区的分布、及其与 RDV 的相互影响开展了初步研究, 获得主要结果如下:

1. 黑尾叶蝉体内两种 RNA 病毒的鉴定

在黑尾叶蝉体内发现 2 种新 RNA 病毒 NcPSRV-1 和 NcNSPV-1。NcPSRV-1 是正义单链 RNA 病毒, 属小 RNA 病毒目、传染性软腐病病毒科, 基因组全长 10,180 bp, 仅 1 个 ORF 区域 (261-9,839), 占基因组全长的 94%。NcNSRV-1 是负义单链 RNA 病毒, 属单股负链 RNA 病毒目、弹状病毒科, 基因组全长 12,337 bp, 具 5 个 ORF 区域。

2. 黑尾叶蝉体内新 RNA 病毒的分布

采用实时荧光定量 PCR 对新 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内的时空转录特征以及在 15 个全国水稻产区的地区分布作了分析。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉唾液腺和中肠中的含量较高, 而在卵巢和精巢中较少; 在黑尾叶蝉各个发育阶段都能被检测到, 且含量无明显差异。NcNSRV-1 在黑尾叶蝉广东广州种群中的带毒率明显较高, 而在贵州贵阳种群和河南信阳种群中未能检测到。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉不同地区种群均有分布, 其中广东广州种群中的带毒率为最低, 而在贵州贵阳种群和河南信阳种群中的带毒率则较高。在其他稻田叶蝉中并未检测到 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1。

3. 黑尾叶蝉新 RNA 病毒与 RDV 互作的初探

NcPSRV-1 在黑尾叶蝉种群中的带毒率随室内饲养时间延长而上升，而 NcNSRV-1 正相反，其带毒率逐渐降低，甚至丢失。黑尾叶蝉带毒(RDV)种群对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 的带毒率均相对较低，感染 NcPSRV-1 后亦对 RDV 在黑尾叶蝉种群中的获得与传代存在明显的抑制作用。这表明不同的 3 种 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内存在相互的拮抗作用。

论文结果为深入理解不同 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内的互作机制、并用以开发水稻叶蝉及其传播的病毒病防控新技术和新策略提供了基础。

关键词：黑尾叶蝉；NcNSRV-1；NcPSRV-1；基因组；RNA 病毒；水稻矮缩病毒；实时荧光定量 PCR；表达分析；时空分布；地区种群；带毒率；互作关系

Abstract

The green leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Homoptera: Cicadellidae), is one of the important insect vectors to spread rice dwarf virus (RDV). In order to explore the interaction relationship between RDV and *N. cincticeps*, we recently sequenced the transcriptome of salivary glands and discovered two novel RNA viruses. Their genome organization, phylogenetic status, temporal and spatial transcription, geographic distribution, and interaction relationship with RDV were primarily studied. The main results are shown as follows:

1. Identification of two novel RNA viruses in *N. cincticeps*

Two novel RNA viruses, *Nephotettix cincticeps* positive-strand RNA virus 1 (NcPSRV-1) (Picornavirales: Iflaviridae) and *Nephotettix cincticeps* negative-strand RNA virus 1 (NcNSPV-1) (Mononegavirales: Rhabdoviridae) were obtained from *N. cincticeps*. The complete viral genome of NcPSRV-1 is 10,180 nucleotides in length, containing one open reading frame (261-9,839). The complete viral genome of NcNSPV-1 is 12,337 nucleotides in length, containing five non-overlapping, linearly arranged open reading frames.

2. Distribution of two novel RNA viruses in *N. cincticeps*

The temporal and spatial transcription of NcPSRV-1 in *N. cincticeps* and distribution of NcNSRV-1 and NcPSRV-1 in different populations collected from 15 of rice producing areas in China were characterized by real-time quantitative PCR. The amount of NcPSRV-1 was obviously high in both salivary glands and midgut, but less in ovary and testis. NcPSRV-1 was detected at all developmental stages of *N. cincticeps*, and there is no significant difference in content. NcNSRV-1 had a higher viruliferous rate in Tianhe population of *N. cincticeps* in Guangdong, but was not detectable

in Guiyang population of Guizhou and Xinyang population of Henan. NcPSRV-1 was detected in all different populations of *N. cincticeps*, in which the viruliferous rate was the lowest in the Tianhe population, but the higher in the Guiyang and Xinyang populations. Both NcPSRV-1 and NcNSRV-1 were not detected in other rice leafhoppers.

3. Preliminary exploration of interaction among the viruses

The viruliferous rate of NcPSRV-1 in *N. cincticeps* increased with the prolonging of rearing time in the laboratory, whereas on the contrary, the viruliferous rate of NcNSRV-1 decreased gradually or even lost. The viruliferous rate of NcNSRV-1 and NcPSRV-1 was relatively low in the population of *N. cincticeps* infected with RDV. Meanwhile, the infection of NcPSRV-1 in *N. cincticeps* also significantly inhibited the acquisition and generation of RDV. It indicates that there are antagonistic interactions among different RNA viruses in *N. cincticeps*.

These results provide a basis for further understanding of the interaction mechanism among different RNA viruses in *N. cincticeps*, as well as for development of new techniques and strategies for controlling rice leafhoppers and their transmitted virus diseases.

Key Words: *Nephotettix cincticeps* (Uhler), NcNSRV-1, NcPSRV-1, genome, RNA virus, Rice dwarf virus, Real-time quantitative PCR, Expression analysis, Temporal and spatial distributions, local population, Viruliferous rate, Interaction relationship

目录

致谢	I
前言	II
中文摘要	IV
Abstract	VI
目录	VIII
第一章 文献综述	1
1.1 昆虫 RNA 病毒及其结构	1
1.1.1 (+)ssRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态	3
1.1.1.1 网巢病毒目	3
1.1.1.2 小 RNA 病毒目	4
1.1.1.3 黄病毒属 Flaviviridae	5
1.1.1.4 类 α 病毒 Alphavirus-like supergroup	5
1.1.2 (-)ssRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态	6
1.1.2.1 单股负义病毒目 Mononegavirales	6
1.1.3 dsRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态	9
1.1.3.1 呼肠孤病毒科 Revoviridae	9
1.1.3.2 二分 RNA 病毒科 Birnaviridae	10
1.2 昆虫 RNA 病毒的功能	11
1.2.1 致病性	11
1.2.2 对昆虫行为的影响	13
1.2.2.1 改变昆虫寄主的行为	13
1.2.2.2 改变宿主性别比例	13
1.2.2.3 影响宿主昆虫的行为	14
1.3 病毒与宿主间的互作	14
1.4 展望	17
第二章 黑尾叶蝉体内两种 RNA 病毒的鉴定	19
2.1 材料与方法	20
2.1.1 试验材料	20
2.1.1.1 供试昆虫	20
2.1.1.2 供试水稻	20
2.1.1.3 主要试剂	20
2.1.2 试验方法	20
2.1.2.1 黑尾叶蝉病毒全基因组的克隆与测序	20
2.1.2.2 黑尾叶蝉总 RNA 提取	21
2.1.2.3 cDNA 合成	22
2.1.2.4 RACE	22
2.1.2.5 黑尾叶蝉病毒全基因组序列与系统进化分析	25
2.2 结果与分析	31
2.2.1 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 是一种正义单链 RNA 病毒	31
2.2.2 黑尾叶蝉病毒 NcNSRV-1 是一种负义单链 RNA 病毒	31

2.3 讨论	35
第三章 黑尾叶蝉体内新 RNA 病毒的分布	37
3.1 材料与方法	37
3.1.1 试验材料	37
3.1.2 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 的时空分布	37
3.1.3 不同水稻产区叶蝉的带毒率检测	39
3.1.4 数据分析	41
3.2 结果与分析	41
3.2.1 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 的时空分布	41
3.2.2 黑尾叶蝉 2 种 RNA 病毒的种类与地区分布	43
3.2.3 其他种类叶蝉 2 种 RNA 病毒带毒率检测	44
3.3 讨论	45
第四章 黑尾叶蝉新 RNA 病毒与 RDV 互作的初探	46
4.1 材料与方法	46
4.1.1 试验材料	46
4.1.2 RDV 对黑尾叶蝉 2 种病毒带毒率的影响	46
4.1.3 黑尾叶蝉 2 种 RNA 病毒对 RDV 感染率的影响	47
4.1.4 数据分析	47
4.2 结果与分析	47
4.2.1 RDV 对黑尾叶蝉 RNA 病毒带毒率的影响	47
4.2.2 黑尾叶蝉 RNA 病毒对 RDV 感染率的影响	48
4.3 讨论	48
总结	50
小结与讨论	50
创新之处	52
不足之处及今后研究方向	52
参考文献	53

第一章 文献综述

2009 年, 国际病毒分类委员会 (ICTV) 发布第九次报告, 将病毒分为 6 目、87 科、349 属, 共计有 2,284 种病毒和类病毒 (King 等, 2012)。2016 年发布第十次报告, 新增 2 个目和 38 个科, 并于 2017 年在线作了更新 (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report)。根据遗传物质, 病毒可分为两大类: DNA 病毒和 RNA 病毒。

在病毒的分类地位上, 由属到科的划分比较明确, 一般具有相同基因组结构和高序列相似度的病毒会被划分到同一属。但是, RNA 病毒的种属迄今尚未有公认的划分标准。当前主要依据 RNA 病毒的宿主范围和血清学特征是否相同, 或者核苷酸和氨基酸序列相似度是否低于阈值水平, 来确定 RNA 病毒是否归为同一个种属。当 RNA 病毒的核酸序列相似性达到 75-85% 时, 会被划分到同一属 (Liu 等, 2011)。

1.1 昆虫 RNA 病毒及其结构

昆虫 RNA 病毒大多存在于单股反链病毒目 Mononegavirales、网巢病毒目 Nidovirales 和小 RNA 病毒目 Picornavirales 等 3 个目中。在已知昆虫病毒的 37 个科中, 有 10 个科尚未归入任何目中; 而且尚有十分之一的 RNA 病毒属尚未被归于科当中。自 ICTV 发布第十次报告以来, 昆虫病毒分类又发生一些变化, 其中昆虫 RNA 病毒可归属到 13 科、14 属。根据 RNA 病毒的核酸结构特点, 可分为: (1) 正义单链 RNA 病毒 (positive single-stranded RNA virus, (+)ssRNA virus), 包括双顺反子病毒科 Dicistroviridae、传染性软腐病病毒科 Iflaviridae、黄病毒科 Flaviviridae、披膜病毒科 Togaviridae、杯状病毒科 Roniviridae、 α 四 T 病毒科 Alphatetraviridae、转置四 T 病毒科 Permutotetraviridae、卡尔莫四 T 病毒科 Carmotetraviridae、中等套病毒科 Mesoniviridae 和野田村病毒科

Nodaviridae 等；（2）负义单链 RNA 病毒（negative single-stranded RNA virus, (-)ssRNA virus），包括弹状病毒科 Rhabdoviridae 和尼亚玛尼病毒科 Nyamiviridae 等；（3）双链 RNA 病毒（double-stranded RNA virus, dsRNA virus），包括呼肠孤病毒科 Reoviridae 和二分 RNA 病毒科 Birnaviridae 等。具体的分类情况详见表 1.1。

表 1.1 昆虫 RNA 病毒的主要分类

Table 1.1 Major genera of the RNA viruses that replicated in insects

病毒类型	基因组	分类单元 (目、科或亚科)	代表属	宿主
dsRNA viruses	2 段 3.3, 2.8 kb	<i>Birnaviridae</i>	<i>Entomobirnavirus</i>	<i>Diptera: Drosophila melanogaster</i>
	10-12 段 4.5-0.7 kb	<i>Reoviridae</i>	<i>Cypovirus</i>	<i>Lepidoptera: Bombyx, Helicoverpa armigera</i>
		<i>Spinareovirinae</i>	<i>Idnoreovirus</i>	<i>Hymenoptera: Ichne, Musca domestica</i>
(+)ssRNA viruses	1 段 20-26 kb	<i>Nidovirales</i>	<i>Alphamesonivirus</i>	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>
		<i>Mesoniviridae</i>		
		<i>Picornavirales</i>	<i>Cripavirus</i>	Aphid, Cricket, <i>Drosophila</i>
	1 段 9-10 kb	<i>Dicistroviridae</i>	<i>Aparavirus</i>	<i>Apidae</i>
	1 段 8.5-9.5 kb	<i>Iflaviridae</i>	<i>Iflavirus</i>	<i>Antheraea pernyi</i>
	2 段 3.2, 1.3 kb	<i>Nodaviridae</i>	<i>Alphanodavirus</i>	<i>Bombyx mori</i>
	1 段 11 kb	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Mosquito, Ixodid
	1 段 12 kb	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Mosquito
	1 段 6.6 kb	<i>Alphatetraviridae</i>	<i>Betatetravirus</i>	Moths; Butterflies
	2 段 5.3, 2.5 kb		<i>Omegatetravirus</i>	Moths; Butterflies
	1 段 6.2 kb	<i>Carmotetraviridae</i>	<i>Alphacarmotetravirus</i>	<i>Lepidopteran</i>
	1 段 5.7 kb		<i>Alphapermutotetravirus</i>	<i>Lepidopteran</i>
		<i>Permutotetraviridae</i>		
(-) ssRNA viruses	1 段 11-15 kb	<i>Mononegavirales</i>	<i>Sigmavirus</i>	<i>Drosophila</i>
		<i>Rhabdoviridae</i>		

目前，已知的昆虫病毒的种类并不多，而有关昆虫 RNA 病毒的相

关研究总是局限在经济昆虫所携带的病毒上，因此对昆虫 RNA 病毒的研究还有很广阔的待发掘空间。

1.1.1 (+)ssRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态

(+)ssRNA 病毒基因组结构变化较大，其编码方式以及核心基因也存在差异。病毒粒子包膜与否也有差异性。

1.1.1.1 网巢病毒目

网巢病毒目 Nidovirales 的病毒都是有包膜的大病毒粒子，其基因组片段长度一般超过 20 kb。该病毒目中研究较多的病毒是能感染人类的冠状病毒科 Coronaviridae 病毒 (Peiris 等, 2003)，而能感染昆虫的主要是中等套病毒科 Mesoniviridae 病毒 (Lauber 等, 2012)。在库蚊中发现的南定病毒 Nam Dinh virus 病毒 (NDiV, Mesoniviridae, Alphamesonivirus) 直径为 60-80 nm (Nga 等, 2011; Zirkel 等, 2013)。该病毒目有相似的基因组结构，而且非结构蛋白二级结构相似性也较高。网巢病毒目病毒基因组由两个较长的重叠开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 区域 (ORF 1a 和 1b) 编码，通过移码突变从而翻译为一条多肽链，即在翻译过程中将一个核苷酸向后移动而不释放新生多肽，导致 mRNA 在不同区域中持续翻译。ORF 1a 编码了类 3C 半胱氨酸蛋白酶域和包裹该蛋白的疏水区域。ORF 1b 编码 (从 5'→3') 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp)、解旋酶 (HEL)、3'→5'核糖核酸外切酶 (ExoN) 和 2'-O-甲基转移酶域。有研究认为 ExoN 能够调控 RNA 复制的保真度，从而使该目病毒存在有较大基因组的病毒 (Nga 等, 2011)。近 3'端的 ORFs 通过编码核衣壳蛋白和表面糖蛋白，从而调控 RNA 负链模板上亚基因组的合成 (Cowley 等, 2002) (见图 1.1 A)。

1.1.1.2 小 RNA 病毒目

大部分昆虫 RNA 病毒都集中在小 RNA 病毒目 Picornavirales。该病毒目中昆虫 RNA 病毒与脊椎动物病毒（如脊髓灰质炎病毒和手足口病毒等），有着类似结构的单链正义 RNA 基因组，病毒粒子直径一般在 30 nm 左右（Gall 等, 2008），为无囊膜的正二十面体等轴颗粒。该目中昆虫 RNA 病毒有双顺反子病毒科 Dicistroviridae 和传染性软腐病病毒科 Iflaviridae。双顺反子病毒科包含 Aparavirus（急性蜜蜂麻痹病毒 Type species Acute bee paralysisvirus）和 Cripavirus（蟋蟀麻痹病毒 Type species Cricket paralysis virus）。传染性软腐病病毒科只有一个属 Iflavirus（蚕软腐病毒 Type species Infectious flacherie virus）。本目病毒中的蛋白与 5'端（Vpg）和 3'端 poly(A)共价相连，而且该目病毒有一个较大 ORF 区，该区域用来编码保守非结构域。复制蛋白排列顺序从 5'端到 3'端分别是 2C 解旋酶、类糜蛋白酶的 3C 蛋白酶和 3D RNA 聚合酶。基因组 5'非编码区（UTR）长约 178-964 nt，短于哺乳动物的 600-1,200 nt。5'非编码区具有复杂的二级结构，包括茎-环（stem-loop）和假结（pseudoknot），还有内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site, IRES）。3'非编码区较短，约 155-295 nt，该区域在病毒基因组负链合成中起重要作用（见图 1.1 B）

野田村病毒科（棚病毒 Flock House virus）只有小 RNA 病毒目病毒特有的 RdRp,但是不具备 HEL、Vpg 和 3C-蛋白酶（Koonin 等, 2008）（见图 1.1 D）。有些未归入任何一个科的昆虫 RNA 病毒含有与野田村病毒类似的基因结构，比如慢性蜜蜂麻痹病毒（Chronic bee paralysisvirus）（Olivier 等, 2008）、蜜蜂病毒（honeybee virus）、西奈山病毒-1（Lake Sinai virus strain 1）（Runckel 等, 2011）和蚊子莫西病毒（mosquito Mosinovirus）（Schuster 等, 2014）等。而转置四 T 病毒科 Permutotetraviridae,如刺蛾 β 四体病毒（Euprosteria elaeasa virus），只有类小 RNA 病毒 RdRp 的 palm 子域衍生而来的非典型 RdRp 域（Gorbalenya 等, 2002; Zeddarn 等, 2010; Ferrero 等, 2015）（见图 1.1 E）。

类小 RNA 病毒是较小的等轴病毒，有些尚未被 ICTV 分类，如红火蚁相关的红火病毒-1 (*Solenopsis invicta virus 1*) 和滤过性病毒 (*Solenopsis invicta virus 1*) (Valles 等, 2014; Valles 和 Hashimoto, 2009) 和感染黑腹果蝇的诺拉病毒 (*Nora virus*) (Habayeb 和 Ekengrent, 2006)。这些病毒有完整的类小 RNA 病毒的非结构基因，但结构基因和小 RNA 病毒科不同。

1.1.1.3 黄病毒属 Flaviviridae

黄病毒属的昆虫 RNA 病毒大致分为两类，一类是在蚊子体内复制的虫媒病毒 (arboviruses)：黄热病毒 (*Yellow fever virus*)、登革热病毒 (*Dengue virus*) 和寨卡病毒 (*Zika virus*) 等；另一类是在蜱虫体内的蜱传脑炎病毒 (*Tick-borne encephalitis virus*) (Gaunt 等, 2001)。

黄病毒属的病毒是球形的包膜病毒粒子，直径为 50 nm。成熟的病毒粒子含有两种病毒编码的糖基化膜蛋白：糖基化膜蛋白 E (血凝素) 和糖基化膜蛋白 M。黄病毒属病毒的 RNA 基因组长约 11 kb，包含编码 5' 部分的 7-甲基鸟嘌呤-3 磷酸核苷帽子 (m⁷Gppp) 结构和一个长 ORF 区，近 5' 端编码结构蛋白 M 和结构蛋白 E，近 3' 端编码非结构蛋白，包括 NS3 蛋白酶、RNA 解旋酶和 NS5 RdRp 甲基转移酶。合成后的多肽都是由病毒编码的 NS5 蛋白酶对其进行加工 (Chambers 等, 2009) (见图 1.1 F)。

1.1.1.4 类 α 病毒 Alphavirus-like supergroup

本类群病毒类似于 α 病毒 (Goldbach, 1987; Strauss 和 Strauss, 1988)，与辛德毕斯病毒 (*Sindbis virus*, *Togaviridae*, *Alphavirus*) 有相同的特征 (见图 1.1 G)。 α 病毒属病毒是直径为 40 nm 的球形包膜病毒粒子，其 RNA 基因组长度为 11 kb。这些病毒粒子被组装为 70 nm 的二十面体粒子，40 nm 的粒子中心有 240 个围绕 RNA 基因组的衣壳蛋白 (C)，衣壳核由一层含有两个病毒糖蛋白 (E2 和 E1) 的脂质双层膜覆盖，形成

一个正常的二十面体晶格 (Powers 等, 2012)。其基因组编码调控 RNA 复制的近 5'端的保守非结构域, 蛋白复制的顺序从 5'到 3'为 nsP1 N7-甲基转移酶 (nsP1)、家族 1 解旋酶、蛋白酶 (nsP2) 和 RdRp (nsP4)。另一个比较明显的特征便是在近 3'端有通过亚基因组编码结构蛋白的 ORFs。与感染蚊子和脊椎动物的 α 病毒不同, 本类群病毒只感染鳞翅目昆虫, 如蝶类和蛾类 (Powers 等, 2012)。

1.1.2 (-)ssRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态

昆虫负义 RNA 病毒一般有共同的 RdRp、互补基因组的结束端和衣壳包裹负义基因组, 但它们在粒子形态和基因组结构上表现出很大的差异性。它们的基因组 RNA 总是与核蛋白 (N 蛋白质) 的多个单体相联, 形成高密度结构的丝状核糖核蛋白 (RNP) 或核衣壳, 这些核衣壳, 并不是单纯的 RNA 分子, 而是活跃的转录和复制模板 (Ortin & Martin-Benito 2015)。

1.1.2.1 单股负义病毒目 Mononegavirales

单股负义病毒目的病毒都是含有核衣壳的较大的包膜病毒粒子, 基因组长度约 12-15 kb, RNA 基因组为负链非线性片段。该目的昆虫 RNA 病毒主要集中在弹状病毒科 Rhabdoviridae, 如感染果蝇的西格玛病毒 Sigmavirus, 其 3'末端为自由羟基, 5'末端为三磷酸酯, 基因组两端核苷酸序列反向互补, 为转录和复制的起始信号。通常情况下, 弹状病毒能编码 5 个结构蛋白, 从 3'端开始, 依次包括: 核蛋白 (nucleoprotein, N)、磷蛋白 (phosphoprotein, P)、基质蛋白 (matrix protein, M)、糖蛋白 (glycoprotein, G) 和 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, L) (Dietzgen 和 Kuzmin, 2012) (见图 1.2)。大部分病毒基因组呈现出多元化结构特征, 除 5 个基本的结构蛋白以外, 还编码一些功能各异或功能未知的辅助蛋白 (accessory protein) (Zhang 等, 2003), 因此不同弹状病毒属

间的基因组结构差异很大。

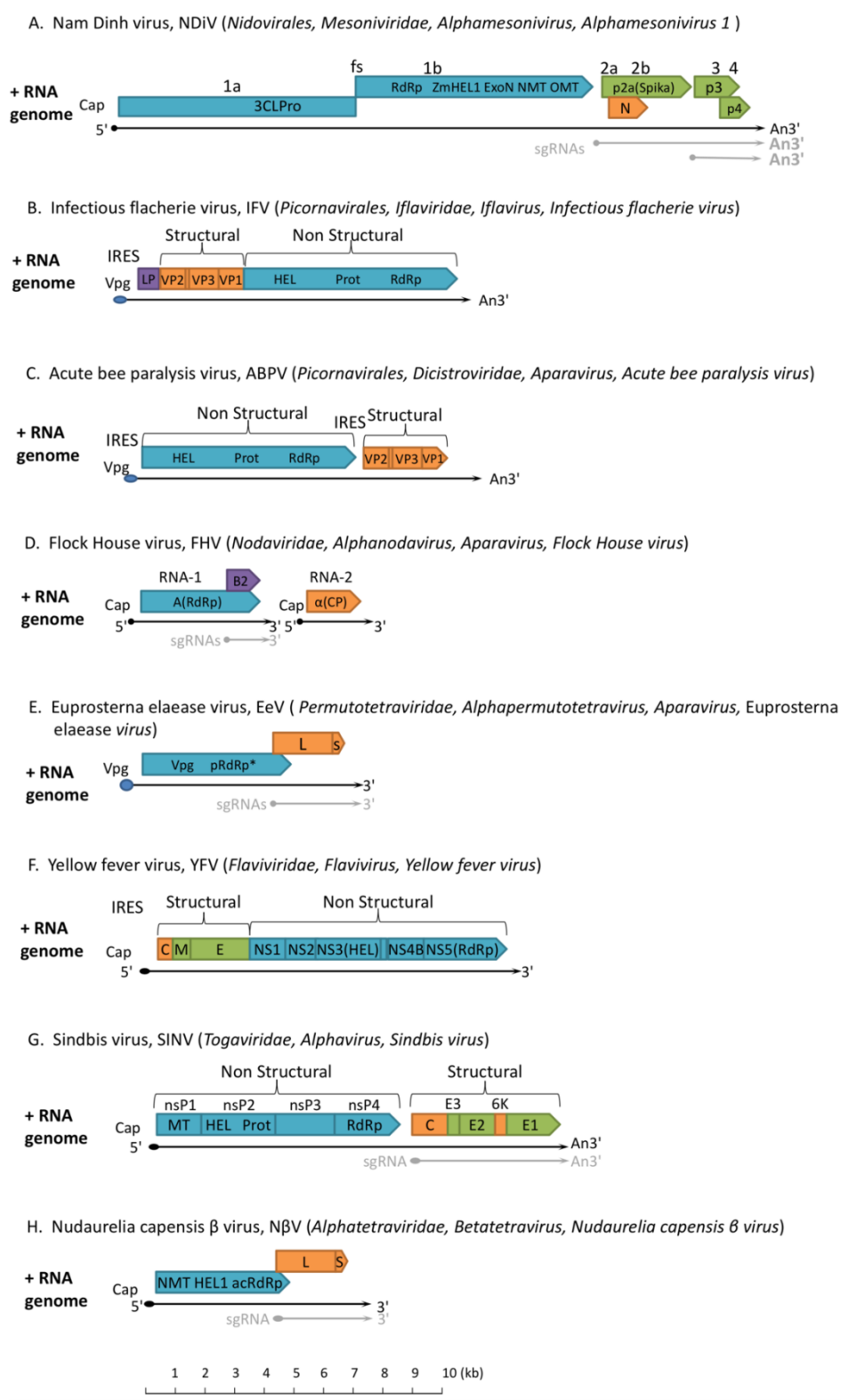


图 1.1. 昆虫(+ssRNA) 病毒基因组结构（仿 Ryabov, 2017）

Fig.1.1 Genome organization of insect positive-strand RNA viruses (by Ryabov,

2017)

注：以上病毒遗传图谱按分类地位依次为：(A)网巢病毒目，海洋 RNA 病毒科；

(B) 小 RNA 病毒科，传染性软腐性病毒科；(C) 小 RNA 病毒科，双顺反子病毒科；(D) 野田村病毒科；(E) 转置四 T 病毒科；(F) 黄病毒科；(G) 披膜病毒科；(H) α 四 T 病毒科。每个病毒遗传图谱都标明了分类地位。较粗的黑线表示病毒基因组 RNA 链；方块状箭头表示 ORF 区域，箭头方向表示翻译方向；ORFs 的颜色示意如下：蓝色为 RNA 复制蛋白，紫色为非结构蛋白，橙色为无膜结构蛋白，绿色为有膜结构蛋白，糖蛋白等。基因组下方的灰色箭头为 mRNA 和参与基因表达的亚基因组 (sgRNA)。5' 端的黑点表示帽状结构，箭头表示 3' 端或者 3-聚腺苷的 3' 端。基因中的缩写名称含义如下：Vpg-与 5' 端基因组共价相连的蛋白；保守蛋白质：RdRp 示依赖 RNA 的 RNA 聚合酶；HEL 示解旋酶；MET-甲基转移酶。IRES 示内部核糖体进入信号；fs 示移码信号。

Note: Genetic maps are given for the members of the following taxonomic groups: (A) order Nidovirales, family Mesoniviridae; (B) order Picornavirales, family Iflaviridae; (C) order Picornavirales, family Dicistroviridae; (D) family Nodaviridae; (E) family Permutotetraviridae; (F) family Flaviviridae; (G) family Togaviridae; (H) family Alphetetraviridae. Full taxonomic classification is given for each virus genome. Genomic RNA strands are shown as thick black lines, block arrows show open reading frames (ORF) and the direction of translation; the ORFs are color-coded as follows: blue, RNA replication proteins; purple, non-structural proteins; orange, structural non-membrane proteins; green, structural membrane proteins, glycoproteins. The mRNAs and the sub-genomic RNAs (sgRNA) involved in the gene expression are shown as grey arrows below the genome. The 5' cap structure shown as a dot at the 5' terminus of RNA, arrowhead indicate the 3' terminus, An3' - polyadenylated 3' terminus. The gene name abbreviations are explained in the article sections describing corresponding taxonomic groups. Vpg - a protein covalently linked to the 5' end of the genomic RNA. Conserved proteins: RdRp means RNA dependent RNA polymerase, HEL means helicase, MET means methyltransferase.

IRES means internal ribosomal entry signal, fs means frameshift signal.

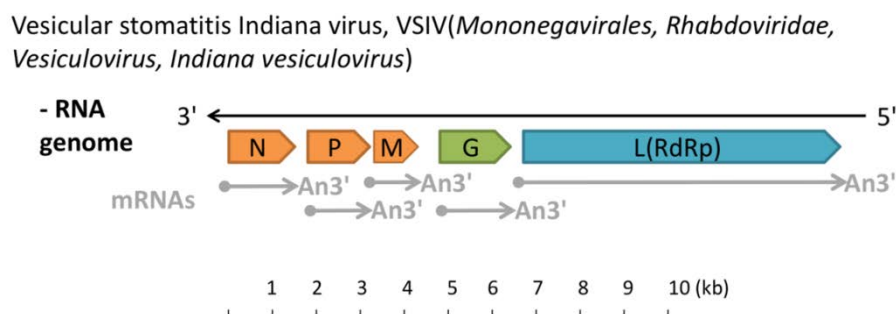


图 1.2 昆虫(-)ssRNA 病毒基因组结构（仿 Ryabov, 2017）

Fig.1.2 Genome organization of insect negative-strand RNA viruses (by Ryabov, 2017)

注：图示为单股负链病毒的基因图谱，其基因组结构如图 1 所示。

Note: Genetic maps are given for the members of order Mononegavirales. The genome structure elements are shown as in Fig. 1.1

1.1.3 dsRNA 昆虫病毒的基因组结构及粒子形态

昆虫 dsRNA 病毒主要分布在呼肠孤病毒科 *Reoviridae* 和二分 RNA 病毒科 *Birnaviridae* 中，但这两科病毒目前都没有划分到任何一个目。它们有不同类型的非包膜病毒粒子、不同的基因组合和基因组片段，最重要的是它们有不同进化谱系的 RdRp。

1.1.3.1 呼肠孤病毒科 *Reoviridae*

呼肠孤病毒科病毒是典型的二十面体非包膜病毒粒子，总直径为 60-80 nm，其蛋白质衣壳有 1、2 或 3 层衣壳蛋白，周围有 1-12 个线性 dsRNA 基因组编码的单个病毒蛋白质。刺突呼肠孤病毒亚科 *Spinareovirinae* 二十面体病毒粒子每 12 个顶点上有高达 11 nm 的刺突。

光滑呼肠孤病毒亚科 *Sedoreovirinae* 与刺突呼肠孤病毒亚科相反，病毒粒子表面相对平滑。呼肠孤病毒科病毒粒子的核心是有转录活性并且具有帽子结构的 mRNA。病毒核是由两种主要蛋白（比如蓝舌病毒 *Bluetonguevirus* 的 VP3 和 VP7 蛋白）组成的多酶复合物，具有由 120 个蛋白质亚基组成的衣壳，衣壳的外部含有 10-12 个 RNA 基因片段，内部包裹着液晶阵列。每一个基因组 RNA 片段都与 12 个复制酶亚基相联，每个复制酶亚基都由 2 到 3 个蛋白质组成，这些聚合体很可能与接近对称的 5 倍轴的衣壳有关(Zhang et al. 2003; Tao & Ye 2003)。蓝舌病毒的 RNA 复制酶有三个肽：VP1（来自负责调控 mRNA 的翻译和 RNAs 基因组的复制的 RdRp）、VP4（负责 mRNA 盖帽的甲基转移酶）和 VP6（解旋酶）（Ramadevi 等, 1998; Boyce 等, 2004）（见图 1.3 A）。

1.1.3.2 二分 RNA 病毒科 Birnaviridae

二分 RNA 病毒科病毒是直径约 65nm 的无包膜单壳病毒粒子，其衣壳由单一类型的衣壳蛋白 VP2 组成。本科病毒粒子含有两个双链线性 RNA 组件，分别为组件 A（3.1-3.6 kbp）和组件 B（2.8-3.3 kbp）。组件 B（VP1 蛋白）编码 RdRp，RdRp 或以自由形态在病毒粒子内表达，或作为 Vpg 蛋白与两基因组的正链 5'端共价连接（Magyar 等, 1998）。组件 A 编码组成病毒粒子衣壳的结构蛋白 VP2、调控病毒多肽合成的 VP4 以及与 RNA 基因组形成的线状核糖核酸蛋白复合物相互作用的 VP3。

二分 RNA 病毒科病毒的显著特征便是其双链 RNA 基因组可与类小 RNA 病毒 RdRp 域相结合（Gorbalenya 等, 2002; Shwed 等, 2002; Koonin 等, 2015）。本科病毒只有一种被识别的昆虫 RNA 病毒，即感染果蝇的果蝇病毒 X（*Drosophila virus X*, DVX）（Chung 等, 1996）。DVX 作为模式生物的路原体，广泛应用于 RNA 病毒与宿主昆虫互作研究，比如病毒抗性研究等等（Wang 等, 2006）（见图 1.3 B）。

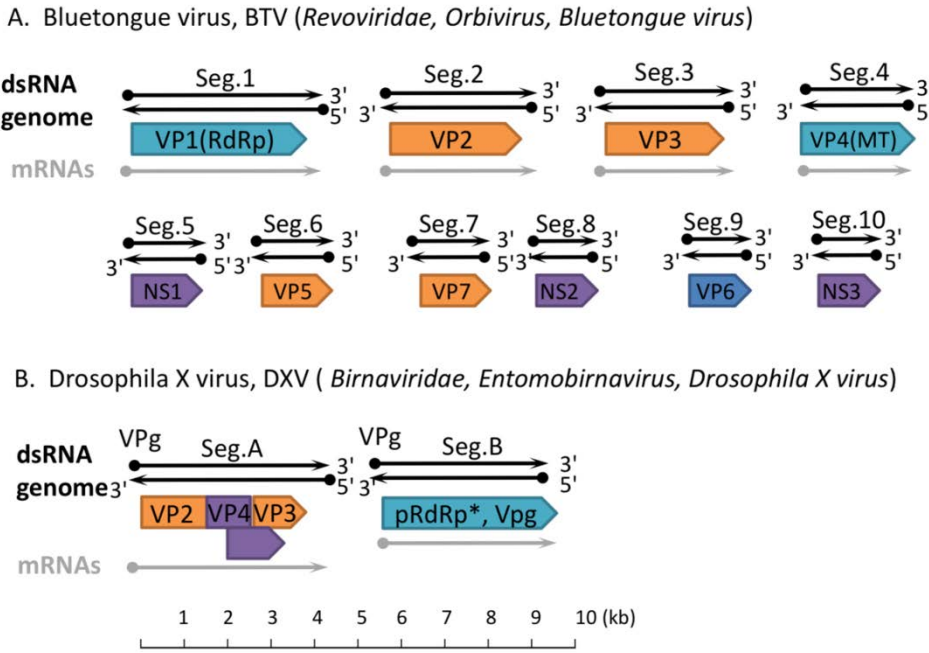


图 1.3 昆虫 dsRNA 主要病毒的基因组结构（仿 Ryabov, 2017）

Fig 1.3 Genome organization of insect double-stranded RNA viruses (by Ryabov, 2017)

注：病毒遗传图谱分类地位依次为：（A）呼肠孤病毒科和（B）二分病毒科。基因组结构图各部分解释见图 1.1。pRdRp*：置换 RNA 聚合酶，Seg：片段。

Note: Genetic maps are given for the members of (A) family Reoviridae and (B) family Birnaviridae. The genome structure elements are shown as in Fig.1.1. pRdRp* means permuted RdRp, Seg. means segment.

1.2 昆虫 RNA 病毒的功能

1.2.1 致病性

昆虫 RNA 病毒很大一部分为其宿主昆虫的病原物。利用其致病性既可以防止家蚕、蜂等益虫的疾病，也可以作为控制害虫的手段，能够减少经济损失，保护农林健康。

目前已在蜜蜂体内发现了多种 RNA 病毒，如囊状幼虫病毒(Chinese

Sacbrood Bee Virus, CSBV) 和慢性麻痹病毒 (Chronic bee paralysis virus, CBPV) 等。其中囊状幼虫病是一种在世界范围内普遍发生的蜜蜂病毒病, 它的主要症状是蜂群的幼虫不能化蛹, 从而导致大量死亡, 使蜂群数量急剧下降。在二十世纪, 我国中蜂就曾爆发囊状幼虫病, 导致中蜂种群减少数十万, 以至我国南方诸多省市的中蜂生产遭受重大损失 (Shan 等, 2017)。蜜蜂慢性麻痹病毒对蜂群的危害主要表现为影响成年蜂的寿命, 大多数染病蜂群 3-4 天出现病状, 4-5 天后开始大量死亡 (Ribiere 等, 2017)。另外其它经济昆虫如蟋蟀也会遭病毒 (如蟋蟀麻痹病毒 Cricket paralysis virus, CRPV) 的危害 (Garrey 等, 2010)。对昆虫 RNA 病毒的研究, 能提供有效防治这些昆虫 RNA 病毒病的方法和途径。

目前, 已有研究成功分离并合成了具有抗病毒感染的干扰素 (Osterlund 等, 2007) 和白介素 (Maynard 等, 2007) 以及病毒相关的 DNA 或 cDNA, 而且发现能够阻断病毒转录和翻译的小分子, 如反义寡核苷酸 (AODN) (Ryte 等, 1993) 等。这些 DNA、cDNA 或小分子 RNA 通过质粒表达后, 不仅可以插入细胞染色体, 还可以使转化细胞获得抗病毒的功能, 据此, 现在有关动物抗病毒感染的基因工程育种工作也相继开展, 为探索防治益虫疾病提供了新思路。

昆虫病毒作为新型的生物杀虫剂, 具有良好的应用前景。如今, 中国已经在利用质型多角体病毒 (CPV) 防治害虫领域取得了进展。中科院武汉病毒所彭辉银研究员团队所研究的“生物导弹”新技术, 已在松毛虫的防治上获得成功。生物导弹技术是利用寄生赤眼蜂特有的行为特点, 与昆虫病毒特性相结合, 将经过处理的强毒力病毒制剂传递到靶害虫卵的表面, 使初孵幼虫得病死亡, 从而达到控制害虫的目的。“生物导弹”技术, 不仅能有效地控制害虫大面积发生, 而且对人和家畜以及天敌无害, 环境友好 (童清和彭辉银, 2009)。山东在利用赤松毛虫 CPV 大面积防治赤松毛虫, 广东和云南分别在利用马尾松毛虫和文山松毛虫 CPV 防治松毛虫方面, 都取得了良好的效果。

1.2.2 对昆虫行为的影响

昆虫 RNA 病毒不仅可以对宿主昆虫的生物学指标产生影响，还可以从活动行径和性别比例等方面调控昆虫的行为特征。

1.2.2.1 改变昆虫寄主的行为

瓢虫茧蜂 *D. coccinellae* 通过将卵产于大斑长足瓢虫 *Coleomegilla maculata* 体内，利用病毒来调控寄主瓢虫的行为（Dheilly 等, 2015）。瓢虫茧蜂的卵在瓢虫体内孵化，20 天后寄生蜂的预蛹冲破瓢虫体壁，然后在瓢虫的足间结茧。而在此期间，瓢虫将身体覆盖于寄生蜂的茧上，保护茧使之不会被其他生物捕食（Maure 等, 2013; Dheilly 等, 2015）。在此过程中，瓢虫的行为发生了改变，如部分瘫痪和震颤等，这表明瓢虫的神经系统可能紊乱。有研究表明，瓢虫茧蜂体内的瓢虫茧蜂麻痹病毒 DcPV（属传染性软腐病病毒科 Iflaviridae），在茧蜂的幼虫内复制，大量存在于成蜂输卵管细胞中。茧蜂破体结茧之前，茧蜂幼虫会将 DcPV 传播到瓢虫体内。该病毒在瓢虫的脑部进行复制，并使瓢虫脑部产生严重病变，从而导致瓢虫瘫痪和震颤。瓢虫抗病毒机制也会被诱导产生，待病毒消除后，瓢虫行为便会恢复正常。除了瓢虫茧蜂，其他寄生蜂可以诱导产生这种类似的保镖行为（van Houte 等, 2013; Maure 等, 2013）。

1.2.2.2 改变宿主性别比例

有些昆虫 RNA 病毒中可以通过垂直传播来影响宿主的性别决定机制，甚至改变宿主的性别比例。有研究发现，在蝶蛹金小蜂上存在一种新的病毒 PpNSRV-1（*Pteromalus puparum* negative-strand RNA virus 1），属尼亚玛尼病毒科 Nyamiviridae。该病毒可以通过减少蝶蛹金小蜂子代雌蜂数来调控寄生蜂的子代性比，由它介导的性比调控可能为雌性致死类型，可能是由于带毒的雌虫对病毒不适所造成。与大多数的性比失调不同，该病毒也可以通过雄性垂直传播，雄性甚至有更高的传播效率，

且该病毒还可延长雌蜂和雄蜂的寿命（Wang 等, 2017）。

1.2.2.3 影响宿主昆虫的行为

昆虫的行动路径和各种行为也会受到 RNA 病毒的影响，比如，能够影响蚜虫行为的两种病毒：ALPV 和 RhPV。ALPV 为蚜虫致死麻痹病毒，属双顺反子病毒科 Dicistroviridae，可以引起禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 不正常的运动综合症，该症会使感毒蚜虫运动不协调，最终远离食物源（Whitfield, 1998）。目前尚无研究针对这种行为的利弊做出评判。RhPV 为禾谷缢管蚜病毒，也属双顺反子病毒科 Dicistroviridae，与 ALPV 密切相关，可以改变蚜虫的聚集行为。禾谷缢管蚜在正常情况下会被同类的气味吸引，并聚集在一起。若禾谷缢管蚜感染 RhPV 后，便不会被健康的蚜虫气味吸引，而且健康或者带毒的蚜虫都不会被带毒蚜虫的气味所吸引（Ban 等, 2008）。这个行为改变，有利于整个蚜虫的种群，可以降低在同植株上同品系蚜虫感染病毒的风险；而对该病毒而言，这可以帮助病毒扩散到其他品系的蚜虫上，使该病毒的有更广的扩散区域。

1.3 病毒与宿主间的互动

RNA 病毒侵染到宿主昆虫体内后，昆虫免疫机制被激活，产生针对病毒的抵抗反应，而这种反应的差异性，也会对病毒的致病性和传播造成影响。

比较典型的是的果蝇对 DCV 的反应机制。DCV 作为模式生物的 RNA 病毒，对该病毒的研究比较透彻。在自然条件下，感毒果蝇不会表现出明显的症状，若把病毒粒子直接注射到果蝇的血腔内，则会对果蝇产生很强的致病性。研究结果显示，将 RNA 病毒注射到血腔，使之绕过了关键的免疫防御系统（Sparks 等, 2008）。果蝇对进入体内病毒的防御反可分为：JAK-STAT 通路调控的体液免疫和细胞内的 RNA 干扰（RNA

inference, RNAi) 等机制类型 (Beutler 等, 2007)。

JAK-STAT 通路: 果蝇口服 DCV 后, 其体内包括编码抗菌肽 Drosomycin、attacin A、cecropins A1 和 A2 基因在内的 11 个基因受到诱导表达 (Roxström-Lindquist 等, 2004)。而直接注射 DCV 病毒后, 果蝇体内有包括血淋巴蛋白基因在内的 140 多个基因表达上调 (Oti 等, 2008)。诱导表达的这些基因只有一部分与 JAK-STAT 通路相关, 且与 Toll 或 IMD 免疫信号通路中的蛋白基因无关联。也有研究证明, 果蝇体内编码 JAK 激酶的 hopscotch 基因发生突变时, 会增加果蝇对 DCV 的敏感性 (Agaisse 和 Perrimon, 2004; Hedges 和 Johnson, 2008)。

RNAi 机制: 由三个依赖 RNA 的小型沉默通路组成, 以该序列特有的方式调控基因表达 (Sabin 等, 2010)。RNAi 不仅调节可以内源性基因表达, 还可以调控外源 RNA, 包括病毒 RNA 的表达 (Mueller 等, 2010)。在果蝇体内, 病毒侵染会导致病毒衍生出 siRNAs, 从而产生大量的病毒。经检测, 核心 siRNA 的突变会增加果蝇对 RNA 病毒侵染的敏感性。除诺拉病毒 (Nora virus) 之外, 还有许多 RNA 病毒如 DCV, CrPV, FHV, DXV, SINV, VSV, WNV 和 RVFV 等也有类似的结果 (Van Rij 等, 2006; Zambon 等, 2006; Chotkowski 等, 2008; Sabin 等, 2009; Mueller 等, 2010; Nayak 等, 2010; Van Mierlo 等, 2012)。这是由于 Dcr-2 生产的病毒衍生出 siRNAs, siRNAs 通过 RNAi 途径发挥了抗病毒作用。不过最近的证据也表明, Dcr-2 也可能在病毒 dsRNA 的结合和识别过程中触发下游的抗病毒信号的级联反应 (Deddouche 等, 2008)。Dcr-2 属于 DExD/ H-box 螺旋酶家族, 是昆虫体内最接近哺乳动物的类 RIG-I 受体, 可识别细胞质病毒 RNA 并作出反应。病毒 RNA 与 Dcr-2 的接触不仅可以引发 RNAi 来抑制病毒复制, 还能激发一种特定的转录反应, 如能激活果蝇和蚊子体内的抗病毒效应物 Vago (Deddouche 等, 2008; Paradkar 等, 2012)。尽管 Dcr-2 诱导的全谱基因是未知的, 但研究结果表明, 这种昆虫细胞质传感器可能会对病毒复制产生复杂的反应, 类似于哺乳动物的先天免疫反应。RNA 甲基转移酶 Dnmt2, 作为一个潜在的传感器, 最近被证明

可以结合 DCV 的 RNA 并调控病毒的侵染 (Durdevic 等, 2013)。

Toll 通路和 IMD 通路也会被其他侵染的 RNA 病毒激活(见图 1.4)。

Toll 通路：虽然 Toll 受体最初是在果蝇体内发现的，随后证明 Toll 受体在免疫防御中发挥重要作用，随后哺乳动物体内也发现了类 Toll 受体 (TLRs) (Lemaitre 等, 1996; Fitzgerald 和 Chen, 2006; Lemaitre 和 Hoffmann, 2007)。尽管 Toll 通路的抗病毒机制还未完全明确，但有研究发现, DXV 侵染果蝇以及登革热病毒侵染埃及伊蚊后都会激活 Toll 通路 (Xi 等, 2008; Ramirez 和 Dimopoulos, 2010); 但是这些病毒侵染后并没有激活 Toll 通路的 NF κ B 家族基因，而是通过尚未明确的非普通方法激活抗病毒机制。在果蝇体内发现存在另一种与 NF κ B 家族无关的 VSV 糖蛋白 Toll 受体 (Toll-7)，该受体可激活抗病毒的自噬过程 (Shelly 等, 2008; Nakamoto 等, 2012)。

IMD 通路：IMD 通路也是 NF κ B 相关通路，在果蝇和蚊子的免疫体系中也发挥重要作用。IMD 途径可以有效控制辛德毕斯病毒 (SINV) 和蟋蟀麻痹病毒 (CrPV) 在宿主昆虫上的病毒量。不过目前尚不明确 IMD 信号的激活机制以及限制病毒复制的机制 (Avadhanula 等, 2009; Costa 等, 2009)。虽然该通路下游的抗菌肽只是在侵染过程中只受轻微诱导，但研究表明抗菌肽如 DiptB 可以增加果蝇对 SINV 的抗性 (Huang 等, 2013)。

自噬：自噬是一种高度保守的降解机制，细胞通过溶酶体降解途径来分解细胞质内的物质 (Lum 等, 2005)。自噬可以限制多种病原物在宿主体内的复制。果蝇研究也证明，自噬在抵抗细菌和病毒的侵染过程中起到了至关重要的作用 (Shelly 等, 2009)。自噬过程中产生的适配性物质 ref(2)P 可以抑制果蝇体内 Sigmavirus 的复制过程 (Fleuriet, 1980; Contamine, 1981; Nezis 等, 2008)。

Wolbachia：许多共生菌与宿主互利共生，其中 Wolbachia 是一种能感染无脊椎动物的 α 共生菌，能感染 65% 的节肢动物 (Jeyaprakash 和 Hoy, 2000; Hilgenboecker 等, 2008)。研究表明，Wolbachia 可以增加果

蝇对昆虫 RNA 病毒的抗性，包括有 DCV、FHV、CrPV 和 Nora 病毒等（Teixeira 等, 2008）。此外，感染 Wolbachia 果蝇体内的虫媒病毒如西尼罗病毒（West Nile virus, WNV）的复制也受到抑制（Glaser 和 Meola, 2010）。

1.4 展望

包括昆虫在内的所有生物都面临着病毒性病原体的侵袭。为了成功地复制，病毒进化出了无数的逃避策略。昆虫利用看似简单的免疫系统来对抗 RNA 病毒侵染。了解抗病毒防御的相关因素和途径，不仅有助于我们了解昆虫免疫防御的基本原理，还可以让我们学习自身免疫相关理论。此外，各种各样的病毒性病原体可以通过吸血昆虫传播给人类和牲畜，这些节肢动物的病原体为了能够成功地在脊椎动物和无脊椎动物中扩散，进化出在两种宿主中复杂逃避策略。事实上，昆虫能有效地抑制这些 RNA 病毒的发病机制，而许多脊椎动物被感染后则表现出严重的感染症状。因此，对昆虫 RNA 病毒与宿主之间互作的研究能够为我们控制病毒性病原体打下良好的基础。

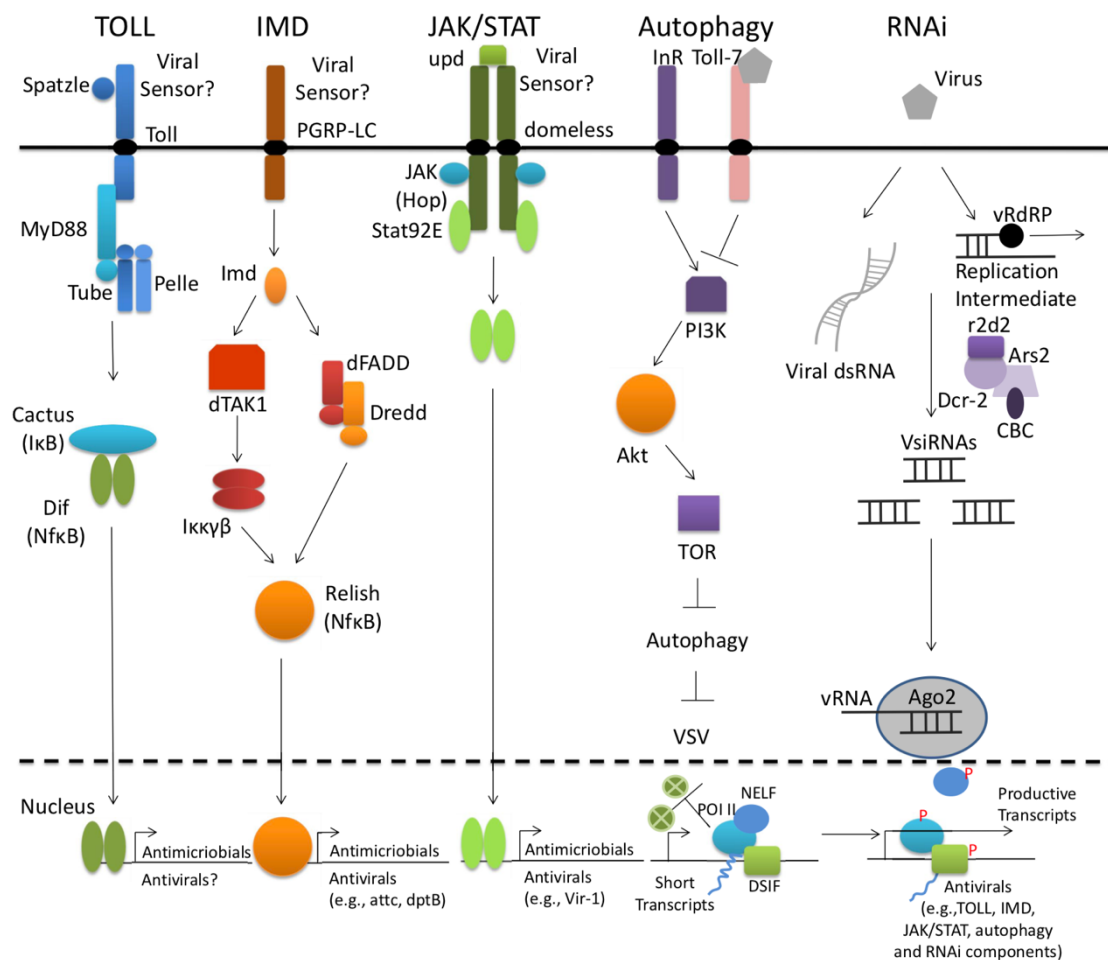


图 1.4 果蝇对 RNA 病毒的免疫反应通路图（仿 Xu 和 Cherry, 2014）

Fig.1.4 Antiviral innate immune pathways in *Drosophila* (by Xu & Cherry, 2014)

注：抗病毒免疫通路包括 Toll 通路、IMD 通路、JAK/STAT 通路、Toll-7 自噬途径和 RNA 沉默途径等。

Note: The Toll pathway, IMD pathway, JAK/STAT pathway, Toll-7-autophagy pathway and the RNA silencing pathway are shown as they relate to antiviral immunity.

第二章 黑尾叶蝉体内两种 RNA 病毒的鉴定

黑尾叶蝉不仅能通过吸汁直接为害水稻，而且还是 RDV、水稻黄矮病毒 (Rice yellow stunt virus, RYSD) 和黄萎病毒 (Rice yellow dwarf virus, RYDV) 等重要传播媒介 (Fukusni, 1940)。其中，RDV 属呼肠孤病毒科植物呼肠孤病毒属，为双链 RNA 病毒 (Suzuki, 1989)。RDV 可以在其寄主黑尾叶蝉体内进行复制与增殖，并通过叶蝉取食感病水稻后，再取食健康水稻进行交互传播。病毒在叶蝉和植物中均能增殖，分布无组织局限性。两者相互作用引起的水稻矮缩病病害，可以造成被感染水稻的大面积减产，对水稻生产造成严重的损失。因此，探明黑尾叶蝉对 RDV 的传播机制以及两者的互作关系以有效防控叶蝉暴发和水稻矮缩病流行极为迫切。

由此，所在实验室对有无携带 RDV 病毒的黑尾叶蝉唾液腺进行转录组测序和分析，却在其中发现了类似病毒的片段，并显示可能是未见有报道的新病毒。迄今，半翅目昆虫体内发现的病毒可归为 3 类 4 个科：分段双链 RNA 病毒 (呼肠孤病毒科 Revoviridae)，正义单链 RNA 病毒 (传染性软腐病病毒科 Iflavirus 和双顺反子病毒科 Dicistroviridae) 和负义单链 RNA 病毒 (弹状病毒科 Rhabdoviridae) 等。鉴于不同病毒的致病性不同以及在同一宿主体内可能存在竞争关系，因此不仅可利用来生物防治黑尾叶蝉，还可利用对传播的其他病毒如 RDV 等的竞争抑制效应来防控水稻病毒病的发生。

为此，本章通过分子生物学方法，克隆获得新病毒完整基因组序列，经序列对比和系统发育关系分析，明确新病毒的分类地位，为进一步探明其分布以及与 RDV 互作关系提供基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 试验材料

2.1.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉采集于浙江杭州的浙大紫金港校区试验农场。田间采得的黑尾叶蝉在室内采用水稻苗连续培养 3 代以上，供试验用。饲养条件：温度 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\pm 5\%$ 、光强度 12000-14000 Lux 和光周期为 14h:10h（光照:黑暗）。

2.1.1.2 供试水稻

黑尾叶蝉室内饲养采用感虫粳稻品种：台中在来 1 号（Taichung Native 1, TN1），分别使用秧龄为 7d 左右和 30d 左右的稻苗来供叶蝉若虫取食和成虫产卵。用于稻苗水培的营养液配方见表 2.1。

2.1.1.3 主要试剂

用于基因克隆的相关试剂，如 Trizol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、普通 PCR 试剂盒和 SYBR 定量 PCR 试剂盒等购于大连宝生物工程公司；cDNA 合成试剂盒、DNA Marker、大肠杆菌感受态细胞等购于北京全式金生物有限公司等。其他如质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒等购于上海生工有限公司。

2.1.2 试验方法

2.1.2.1 黑尾叶蝉病毒全基因组的克隆与测序

以黑尾叶蝉唾液腺转录组数据为库，拼接分析得到类病毒序列，根据序列设计引物（表 2.2），验证病毒序列的正确性和完整性。病毒 cDNA

与 RACE 模板制备过程如下。

表 2.1 水稻水培营养液配方 (Yoshida 等, 1976)

Table 2.1 Formula of rice liquid culture medium (by Yoshida *et al.*, 1976)

储备液 I	91.6 g/L NH_4NO_3 ; 88.6 g/L CaCl_2
储备液 II	40.3 g/L NaH_2PO_4 ; 71.4 g/L K_2SO_4
储备液 III	324 g/L MgSO_4
微量元素储备液 IV	1.5 g/L MnCl_2 ; 0.934 g/L H_3BO_3 (硼酸); 0.031 g/L CuSO_4 ; 0.074 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (七钼酸氨); 0.035 g/L ZnSO_4 ; 7.7 g/L FeCl_3 ; 11.9 g/L 柠檬酸 以上试剂分别溶解, 然后加入 50 mL 浓硫酸, 加蒸馏水至 1 L。
配方	储备液 I: 1.25 ml/L; 储备液 II: 1.25 ml/L; 储备液 III: 1.25 ml/L; 微量元素储备液 IV: 1 ml/L 配置完成后需用 NaOH 将 PH 值调至 4.5-5.0, 不可超过 6.0, 稍偏酸无碍。

2.1.2.2 黑尾叶蝉总 RNA 提取

- (1) 根据 TRIzol[®] (Invitrogen, California, USA) 使用说明, 准备 2 ml 离心管, 编号, 加 500 μl TRIzol 提取液, 一粒钢珠, 每管放 1 头雌叶蝉。
- (2) 用 TissueLyser 组织研磨仪以每秒 30 次的频率, 打碎研磨 3 min, 室温放置 5 min 保证其完全裂解。
- (3) 在离心管中加 100 μl 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温静置 2 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 $\times g$ 离心 15 min, 此时溶液分三层: RNA 在上层水相。吸取上清液, 加 250 μl 异丙醇, 轻微震荡, 静置 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 $\times g$ 离心 10min, 去上清。先加 750 ml 无水乙醇, 再加 250 ml DEPC 水, 清洗 RNA。
- (4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 7,500 $\times g$, 离心 5 min, 倒掉上清, 倒置干燥 10 min。加 30 μl

DEPC 水，用枪头轻轻混匀，溶解。

(5) 每个样品浓度经微量分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo scientific, Wilmington, DE) 测定。将 RNA 用 PVDF 膜封存封膜，放在 -70 °C 保存。

2.1.2.3 cDNA 合成

使用 TransScript[®] One-step gDNA Removal and cDNA Synthetic SuperMix (全式金，北京，中国) 逆转录试剂盒，据其说明书，以上述 RNA 为模板合成 cDNA。

(1) 分别向 PCR 管中加入：

Total RNA	1 µg
Anchored Oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µl
Random primer	1 µl
TransScript RT/RI Enzyme Mix	1 µl
2× TS reaction Mix	10 µl
gDNA Remove	1 µl
Rnase-free Water	to 20 µl

轻轻混匀，甩至管底。

(2) 在 PCR 中执行程序：25 °C 10 min；42 °C 2 h；85 °C 5 min。将获得 cDNA 置于 -20 °C 冰箱保存。

2.1.2.4 RACE

采用软件 Primer Premier 5.0 分别设计特异性引物 (表 2.2)，由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成，用于病毒基因组的 PCR 克隆。使用 SMART[™] RACE cDNA amplification (Clontech, California, USA) 试剂盒，按照说明书步骤，克隆病毒的 5' 和 3' 端序列。

所有的 PCR 扩增产物均克隆至 pET-28a 质粒载体上，并送至上海铂

尚公司测序。

表 2.2 黑尾叶蝉病毒基因组克隆的引物序列

Table 2.2 Cloning primers for viral genomes from *Nephotettix cincticeps*

Primers	Position in Genomes	Oligonucleotide (5'→3')	Orientation	Application
NcNSRV-1 (Nephotettix cincticeps negative-strand RNA virus 1)				
C53292F-1	1-25	CCTGAGTCCTGGAAGACTGAGTCAT	→	To confirm viral genome
C53292R-1	895-917	CCGGTACCACATTATCAGTCCCA	←	
C53292F-2	787-809	CTAAGGATAGAGTCGCTGCCCTT	→	
C53292R-2	1695-1714	TTGATGGTGGATGCGGAGAG	←	
C53292F-3	1559-1578	TCGGGGTAACAATGTCGCAT	→	
C53292R-3	2429-2452	TCAGAGTGGTGATGTTATCATCGG	←	
C53292F-4	2311-2331	TCAGCACAAGCTTTCGTGGAG	→	
C53292R-4	3196-3217	TGTCCATTCTCCCAAGTCTCCT	←	
C53292F-5	3095-3116	TTGATTCGATATGGATTTCGG	→	
C53292R-5	3922-3947	GTCAATAACAGAGAATTTTCCCAAG	←	
C53292F-6	3842-3863	TCACGGTCTCCTGGTCAGTAAG	→	
C53292R-6	4730-4754	TCATAAGATCCTCCATCAGACAGTG	←	
C53292F-7	4603-4625	TCGTTCAAGGGATTAGACACCAT	→	
C53292R-7	5478-5501	TCTCTCCCATCCATACTGACCAAG	←	
C53292F-8	5338-5360	CAAGAAGGGCAACAAAGCTTAGC	→	
C53292R-8	6177-6200	TTATCGCTCGGTATCCTTCATTCT	←	
C53292F-9	6053-6077	GCACAGAGATTCAACTGTCTCCTAT	→	
C53292R-9	6961-6982	TAATCTGGGTTCGTTCTTCCT	←	
C53292F-10	6839-6859	TCGGTGATCATTAGATGGCTG	→	
C53292R-10	7686-7711	TCTACAGGTTTTCTTGAGAGACATGG	←	
C53292F-11	7566-7590	TGGACAATCTGGAGAACTTTCTGTC	→	
C53292R-11	8442-8463	GCCCTCCCTTGGAAGTGTAGAGT	←	
C53292F-12	8340-8364	TCCGAGAATTCCTGAGATTAGCTAC	→	
C53292R-12	9239-9260	TCCCGTAGTTGCTCATACCATC	←	
C53292F-13	9111-9134	TGGTCTCAGGAACCCTAGAACATC	→	
C53292R-13	10007-10028	TGAACAGCTTGTGAAGGCAAGT	←	
C53292F-14	9890-9912	TGGTTCCTGAAATTGGCAAGTCT	→	
C53292R-14	10760-10781	TGAAGATCACTTGAGCCTGAGG	←	
C53292F-15	10601-10625	TACAAGGTTCCCTGTGTTGATCACCT	→	
C53292R-15	11470-11492	TGACATTTGGATGAAGTCTCAGG	←	
C53292F-16	11309-11330	TCTAAGGCAATCCAAGCTCGAT	→	
C53292R-16	11961-11981	TGGGCCCTAACATAGGCATCT	←	

Primers	Position in Genomes	Oligonucleotide (5'→3')	Orientation	Application
NcNSRV-1 (Nephotettix cincticeps negative-strand RNA virus 1)				
C53292F-17	11841-11863	TCCATGGCTTTCCAATCCTATCT	→	
C53292R-17	12316-12337	CGACTACCAGCCCACCAACTAC	←	
C53292GSPF-1	>898	GATTACGCCAAGCTTCCCAACCCTGTCCCACTCAGAGACAACA	→	5'-RACE
C53292GSPR-2	>576	GATTACGCCAAGCTTGTCGGCTCCCATCTCTCTCACGCAT	→	3'-RACE
C53292GSPF-1	>1145	GATTACGCCAAGCTTCGGAGGTCTATCTATGTGGGGTTCAGCC	←	
C53292GSPR-2	>833	GATTACGCCAAGCTTGGAGTGTCCACCTGCCTACCAAATTCCA	←	
NcPSRV-1 (Nephotettix cincticeps positive-strand RNA virus 1)				
C57866F-1	1-20	GAACCTGTCTGTTCGGGCAG	→	To confirm viral genome
C57866R-1	876-896	GTCAATGCGCATCTCTACGGT	←	
C57866F-2	697-720	TAATTAAGGAGAAGAGGCGAGAGG	→	
C57866R-2	1562-1586	GGAGGCAACATTCATTCTATTAGCT	←	
C57866F-3	1418-1439	TGGCACGCCTAATAGTGTTCCT	→	
C57866R-3	2197-2218	TGGTCCACCGTTGAAATTGAAT	←	
C57866F-4	2049-2070	TCGCGTTATACTGATGCAGCCT	→	
C57866R-4	2926-2950	TCAGTCTTAACATCTGGTTGGCTCT	←	
C57866F-5	2816-2837	TGAACACATAGCCCAAGTTTGG	→	
C57866R-5	3648-3668	TCCATCGACATAGGATGCGAT	←	
C57866F-6	3523-3543	TGCTGTCAGGGTACCGTTTCT	→	
C57866R-6	4398-4419	GGTGTGATCTAGGAGCGCTCT	←	
C57866F-7	4295-4320	TCCTGTAGTTATGGCCATAGCATTAG	→	
C57866R-7	5155-5174	TCCAGAACGCGTCACGAAAG	←	
C57866F-8	5054-5073	TGCCCCTGTACCAATAACGG	→	
C57866R-8	5919-5942	GTTTCGCTAGGAGACCCATTTTCAT	←	
C57866F-9	5774-5798	TGAGATGAGTCCACCTGCTAAGATG	→	
C57866R-9	6459-6482	TAACATCATCGTCTTCGTCGACACT	←	
C57866F-10	6341-6364	TAAGATCGATTGGGATAAGAAGCG	→	
C57866R-10	7217-7240	GGAGTAGTATGAATTACCGCGGCT	←	
C57866F-11	7101-7122	GCCGCGACGATTAGATTCATTA	→	
C57866R-11	7957-7977	TACGGCTAAGACGAGTTCCGC	←	
C57866F-12	7835-7856	TATTGCCACTGAAGCCGATCAT	→	
C57866R-12	8739-8760	GATTCATCTTACGGCGGTTACG	←	
C57866R-13	8586-8606	TTAGCGTGGACTTCGTCGGAG	→	
C57866R-13	9130-9149	GCACCGCCGAATGTTCCGAT	←	
C57866GSPF-1	>535	GATTACGCCAAGCTTCTAGGTTGGGGCCCGATGGGGAAGGCAT	→	5'-RACE
C57866GSPR-2	>967	GATTACGCCAAGCTTCGTTTTGGTGGGAGACGGCCGCC	→	3'-RACE
C57866GSPF-1	>1121	GATTACGCCAAGCTTGTCGCGCAAAATTGCTGTGAGTTGATCC	←	
C7866GSPR-2	>1163	GATTACGCCAAGCTTACTGGCGACTACTCGAATTCGGTCTCTG	←	

2.1.2.5 黑尾叶蝉病毒全基因组序列与系统进化分析

- (1) 利用 DNASTar 软件 (Madison, WI, USA) 对以上测序所得到的病毒序列进行拼接与分析。
- (2) 利用在线预测网站的 NCBI ORF finder 来预测并分析病毒基因组中可能存在的开放阅读框 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)。
- (3) 利用开源的 Phobius 网站服务器对病毒每个 ORF 的跨膜蛋白及信号肽预测 (Kall 等, 2007)。并用开源 ProtParam 网站服务器 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对病毒 ORF 的分子量大小及等电点 pI 来进行估算; 利用开源 NetPhos 2.0 网站服务器预测识别每个 ORF 的磷酸化位点 (Blom 等, 1999); 用 NetOGlyc 4.0 (Steentoft 等, 2013) 以及 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测识别每一个 ORF 的糖基化位点; 利用 motif 序列分析工具 MEME 预测病毒基因组的非编码区域上可能有的保守的转录起始和终止序列 (Bailey 等, 2009)。
- (4) 利用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行氨基酸的多重序列比对分析。利用 GeneDoc (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/GeneDoc.shtml>) 进行编辑美化并比对分析结果。
- (5) 利用 NCBI PASC 分类工具对病毒序列进行成对比对分析 (Bao 等, 2014)。利用软件 MEGA 5.05 构建病毒的系统进化树, 采用的是最大似然法, 重复 1000 次的 bootstrap resampling (Tamura 等, 2011)。所有用到的病毒序列登录号都汇总在表 2.3 中。

表 2.3 用于系统发育分析的病毒信息
Table 2.3 Information of viruses selected for phylogenetic analysis

Mononegaviral family	Genus	Natural host	Virus	Virus abbreviation	RefSeq or GenBank accession number
<i>Bornaviridae</i>	<i>Bornavirus</i>	Horses; sheep; cattle; rodents; birds; humans	Borna disease virus 1	BoDV-1	NC_001607
			Parrot bornavirus 1	PaBV-1	GU249595
			Canary bornavirus 1	CnBV-1	KC464471
			Aquatic bird bornavirus 1	ABBV-1	NC_029642
<i>Comovirinae</i>	<i>Comovirus</i>	plants	Cowpea mosaic virus	CPMV	X00206
	<i>Fabavirus</i>	plants	Broad bean wilt virus 1	BBWV-1	AB084450
	<i>Nepovirus</i>	plants	Tobacco ringspot virus	TRV	AY363727
<i>Dicistroviridae</i>	<i>Aparavirus</i>	Invertebrates	Acute bee paralysis virus	ABPV	AF150629
	<i>Cripavirus</i>	Invertebrates	Cricket paralysis virus	CrPV	AF218039
	<i>Triatovirus</i>	Invertebrates	Triatoma virus	TrV	AF178440
			Black queen cell virus	BQCV	AF183905
			Pteromalus puparum small RNA-containing virus	PpSRV	EU680971
<i>Iflaviridae</i>	<i>Iflavirus</i>	Insects	Infectious flacherie virus	IFV	AB000906
<i>Marnaviridae</i>	<i>Marnavirus</i>	Seaweed;	Heterosigma akashiwo RNA virus	HaRNAV	AY337486
<i>Mymonaviridae</i>	<i>Mononegaviruses</i>	fungal plant	Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1	SsNSRV-1	CP002684
<i>Nyamiviridae</i>	<i>Midway nyavirus</i>	Birds; insects	Pteromalus puparum negative-strand RNA virus-1	PpNSRV-1	KX431032

Mononegaviral family	Genus	Natural host	Virus	Virus abbreviation	RefSeq or GenBank accession number
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Nyavirus</i>	Ticks; birds	Nyamanini virus	NYMV	NC_012703
			Midway virus	MIDWV	NC_012702
	<i>Socyvirus</i>	Nematodes	Sierra Nevada virus	SNVV	NC_024376
			Soybean cyst nematode virus 1	SbCNV-1	NC_024702
	<i>Aquaparamyxovirus</i>	Fish	Atlantic salmon paramyxovirus	AsaPV	EF646380
	<i>Avulavirus</i>	Birds	Newcastle disease virus	NDV	NC_002617
	<i>Ferlavirus</i>	Reptiles	Fer-de-Lance virus	FDLV	NC_005084
	<i>Henipavirus</i>	Bats; humans	Hendra virus	HeV	NC_001906
	<i>Morbillivirus</i>	Humans; dogs; cats; cetaceans	Measles virus	MeV	NC_001498
	<i>Respirovirus</i>	Rodents; humans	Sendai virus	SeV	NC_001552
<i>Picornaviridae</i>	<i>Rubulavirus</i>	Humans; apes; pigs; dogs	Mumps virus	MuV	NC_002200
	<i>Aphthovirus</i>	Mostly cloven-hooved animals	Foot-and-mouth disease virus	FMDV	AAG45408
	<i>Aquamavirus</i>	Seals	Seal picornavirus type 1	SePV-1	EU142040
	<i>Avihepatovirus</i>	Ducks and geese	Duck hepatitis A virus 1	DHAV-1	DQ226541
	<i>Avisivirus</i>	Turkey	Turkey avisivirus	TuASV	KC465954
	<i>Cardiovirus</i>	Human, Vertebrates	Encephalomyocarditis virus 1	EMCV-1	M81861
	<i>Cosavirus</i>	Human	Human cosavirus A1	HCoSV-A1	FJ438902
	<i>Dicipivirus</i>	Dog	Canine picodicrovirus	CPDV	JN819202

Mononegaviral family	Genus	Natural host	Virus	Virus abbreviation	RefSeq or GenBank accession number
	<i>Enterovirus</i>	Human	Enterovirus C	EV-C	KY654325
	<i>Erbovirus</i>	Horse	Equine rhinitis B virus 1	ERBV-1	X96871
	<i>Gallivirus</i>	Turkey, chicken	Turkey gallivirus	TuGV	JQ691613
	<i>Hepatovirus</i>	Human, Vertebrates	Hepatitis A virus 1	HAV-1	M14707
	<i>Hunnivirus</i>	Cattle	Bovine hungarovirus 1	BHuV-1	JQ941880
	<i>Kobuvirus</i>	Human; cattle	Aichi virus 1	AiV-1	AB010145
	<i>Kunsagivirus</i>	Bird	Kunsagivirus A1	KuV-A1	KC935379
	<i>Limnipivirus</i>	Teleost fish	Bluegill picornavirus 1	BGPV-1	JX134222
	<i>Megrivirus</i>	Turkey	Turkey hepatitis virus	THV	HM751199
	<i>Mischivirus</i>	Bats	Miniopterus schreibersii picornavirus 1	MsPV-1	JQ814851
	<i>Mosavirus</i>	Canyon mouse	Mouse mosavirus	MoV	JF973687
	<i>Oscivirus</i>	Birds	Oscivirus A1	OsV-A1	GU182408
	<i>Parechovirus</i>	Bank voles; human	Human parechovirus 2	HPeV-2	AJ005695
	<i>Pasivirus</i>	Pigs	Swine pasivirus 1	SPaV-1	JQ316470
	<i>Passerivirus</i>	Birds	Passerivirus A1	PasV-A1	GU182406
	<i>Potamipivirus</i>	eels	Eel picornavirus 1	EPV-1	KC843627
	<i>Rosavirus</i>	Human; rodents	Rosavirus A	RV-A	JF973686
	<i>Sakobuvirus</i>	Cats	Feline sakobuvirus A	SakoV-A	KF387721
	<i>Salivirus</i>	Human and chimpanzee	Salivirus NG-J1	SaV-NG-J1	GQ179640
	<i>Sapelovirus</i>	Pig	Porcine sapelovirus 1	PSV-1	AF406813
	<i>Senecavirus</i>	Pig	Seneca Valley virus 1	SVV-1	DQ641257

Mononegaviral family	Genus	Natural host	Virus	Virus abbreviation	RefSeq or GenBank accession number
	<i>Siccinivirus</i>	Birds	Siccinivirus 1	SiV-1	KF741227
	<i>Teschovirus</i>	Pig	Porcine teschovirus 1	PTV-1	AJ011380
	<i>Tremovirus</i>	Birds	Avian Encephalomyelitis virus 1	AEV-1	AJ225173
<i>Pneumoviridae</i>		Humans; birds	Avian metapneumovirus	AMPV	NC_007652
	<i>Metapneumovirus</i>				
	<i>Orthopneumovirus</i>	Humans; cattle; rodents	Human respiratory syncytial virus	HRSV	NC_001781
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	Plants; insect vectors: aphids, leafhoppers, planthoppers	Lettuce necrotic yellows virus	LYNV	NC_007642
	<i>Dichorhavirus</i>	Plants	Orchid fleck virus	OFV	NC_009609
	<i>Ephemerovirus</i>	Cattle; mosquitos	Bovine ephemeral fever virus	BEFV	NC_002526
	<i>Lyssavirus</i>	Human; mammals	Rabies virus	RABV	NC_001542
	<i>Novirhabdovirus</i>	Fish	Infectious hematopoietic necrosis virus	IHNV	NC_001652
	<i>Nucleorhabdovirus</i>	Plants; insect vectors: planthoppers and aphids	Potato yellow dwarf virus	PYDV	NC_016136
	<i>Perhabdovirus</i>	Fish	Perch rhabdovirus	PRV	NC_020803
	<i>Sigmavirus</i>	Fruit flies	Drosophila melanogaster	DMelSV	NC_013135

Mononegaviral family	Genus	Natural host	Virus	Virus abbreviation	RefSeq or GenBank accession number
Secoviridae			sigmavirus		
	<i>Sprivivirus</i>	Fish	Spring viraemia of carp virus	SVCV	NC_002803
	<i>Tibrovirus</i>	Cattle; water buffalo	Tibrogargan virus	TIBV	NC_020804
	<i>Tupavirus</i>	Birds	Durham virus	DURV	FJ952155
	<i>Varicosavirus</i>	Plants	Lettuce big-vein associated virus	LBVaV	NC_011558
	<i>Vesiculovirus</i>	Humans; cattles; horses; swines; sandflies; blackflies	Vesicular stomatitis Indiana virus	VSIV	NC_001560
	<i>Cheravirus</i>	plants	Cherry rasp leaf virus	CRLV	AJ621357
	<i>Sadwavirus</i>	plants	Satsuma dwarf virus	SDV	AB009958
	<i>Sequivirus</i>	plants	Parsnip yellow fleck virus	PYFV	D14066
	<i>Torradovirus</i>	plants	Tomato torrado virus	ToTV	DQ388879
Sunviridae	<i>Sunshinevirus</i>	Snakes	Sunshine Coast virus	SunCV	NC_025345

2.2 结果与分析

2.2.1 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 是一种正义单链 RNA 病毒

分析黑尾叶蝉唾液腺转录组时,其中一个长度大约为10000bp的相似重叠群,通过BLAST比对,发现其序列与类小RNA病毒序列相似度较高,推测该病毒为小RNA病毒目Picornavirales,传染性软腐病病毒科Iflaviridae,因此将其命名为NcPSRV-1(Nephotettix cincticeps positive-strand RNA virus 1,黑尾叶蝉正链RNA病毒)。之后,通过RT-PCR和RACE进行序列验证。结果表明,该病毒基因组全序列长度为10,180 bp,有一个ORF区域(位于261-9,839),序列长度占整个基因组的94%(图2.1)。

2.2.2 黑尾叶蝉病毒 NcNSRV-1 是一种负义单链 RNA 病毒

该病毒全长为12,337bp,利用在线软件分析对该病毒进行ORFs编码的蛋白特性预测分析,分析结果汇总于表2.4。ORF I编码蛋白与长管茧蜂状病毒Diachasmimorpha longicaudata rhabdovirus(单股负链病毒目Mononegavirales:弹状病毒科Rhabdoviridae)的RdRp序列有较高的相似性,ORF V编码蛋白与三峡水龟病毒Sanxia Water Strider Virus 5(单股负链病毒目Mononegavirales:弹状病毒科Rhabdoviridae)的RdRp有较高序列相似性。其他3个ORFs编码蛋白未发现与之高相似性的蛋白序列。

通过NCBI比对结果,ORF I为核蛋白(Nucleoprotein, N);结合保守结构域信息分析发现,ORF V为大蛋白(Large polymerase protein, L);只有ORF IV具有信号肽序列,而且ORF IV同时具有预测的N糖基化位点和O糖基化位点,为糖蛋白(Glycoprotein, G);ORF II具有多磷酸化位点,判定为磷蛋白(Phosphoprotein, P);ORF III为基质蛋白(Matrix protein, M)。

对NcNSRV-1编码RdRp的核心motif用最大似然法进行系统发育分析，进一步明确了病毒NcNSRV-1与其他负链病毒的关联。

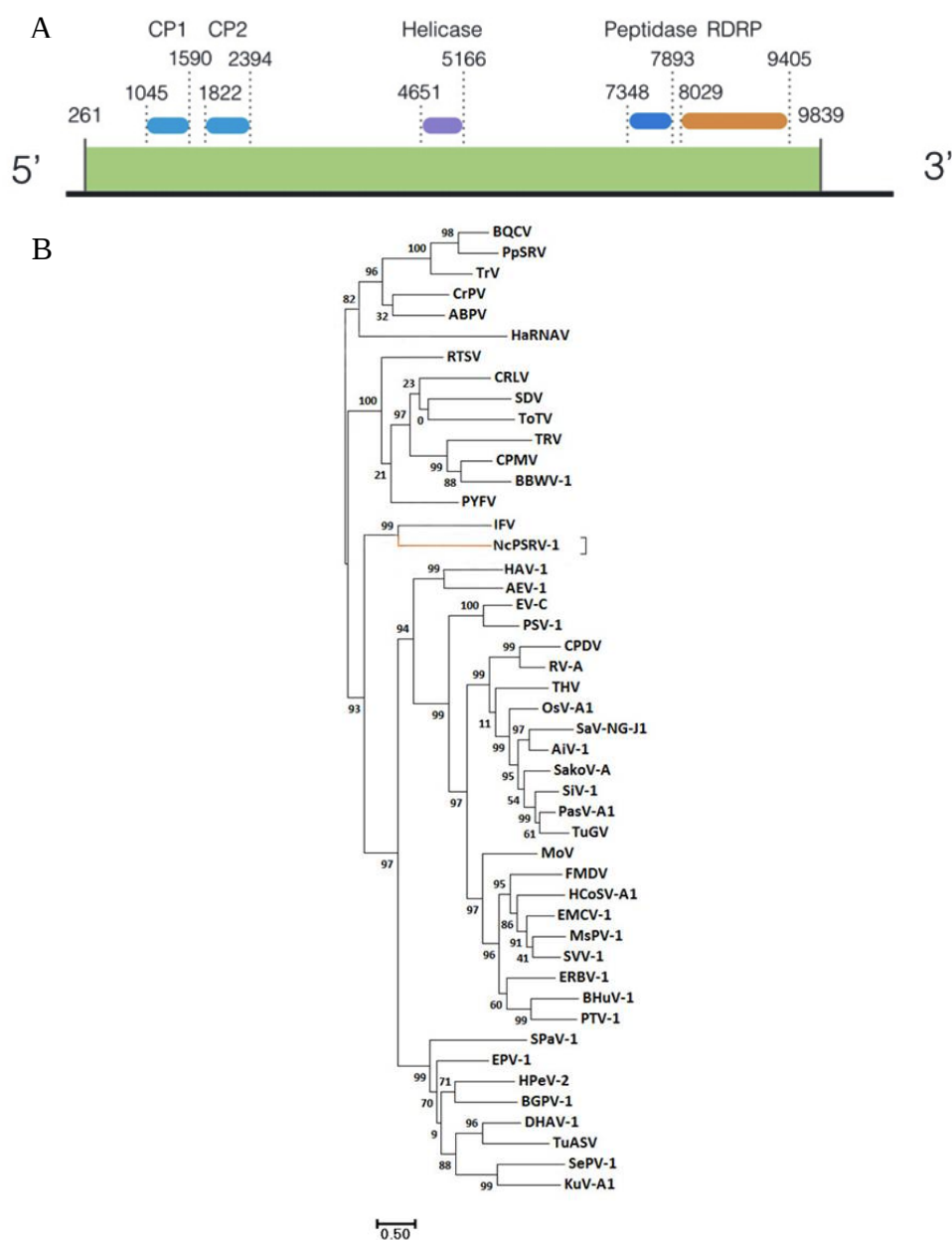


图2.1 黑尾叶蝉病毒NcPSRV-1的基因组结构

Fig.2.1 Genomic organization of NcPSRV-1

注：（A）病毒 NcPSRV-1 的 ORF 区域，大的方框即为 ORF，方框内为不同的衣壳蛋白（CP1, CP2）和非结构蛋白（Helicase 解旋酶，Peptidase 蛋白酶，RdRp 为 RNA-dependent RNA polymerase 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶）。（B）病毒 NcPSRV-1 的系统发育分析：是通过病毒 NcPSRV-1 和其它单股负链病毒的 RdRp

的核心 motif 构建的系统发生树。病毒 NcPSRV-1 的位置用橙色标志，树上显示的是 1000 次重复后的 bootstrap 值。

Note: (A)The ORF of NcPSRV-1, indicate nucleotide positions, and the open box represents the entire ORF. The positions of structural proteins (CP1 protein; CP2 protein) and non-structural proteins (Helicase; Protidase; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) are shown. (B)Phylogenetic analysis of NcPSRV-1: phylogram of the core RdRp motif of NcPSRV-1 and selected viruses from all mononegaviral families. The position of NcPSRV-1 is indicated with an orange line. Bootstrap values in 1,000 replications are shown.

表 2.4 预测的病毒 NcNSRV-1 中 ORFs 的分子特性

Table 2.5 Predicted properties of ORFs in NcNSRV-1

Viral ORF	ORF Length (nt)	Protein Mass (kDa)	pI	Signal peptide	No.of glycosylation sites		No.of phosphorylation sites			BLASTP match	E value
					O-linked	N-linked	Ser	Thr	Tyr		
ORF I	1,314	437	48.52	5.39	3	0	21	15	6	N protein*	3E-04
ORF II	1,020	339	37.91	7.33	10	0	26	10	3	ND**	-
ORF III	759	252	28.58	8.99	6	0	16	10	5	ND	-
ORF IV	1,752	583	66.23	8.04	1	2	48	16	5	ND	-
ORF V	6,867	2,288	261.40	7.09	9	0	142	60	27	RDRP***	0.0

Note: * Diachasmimorpha longicaudata rhabdovirus; ** No significant homology was detected;

***Sanxia Water Strider Virus 5.

A

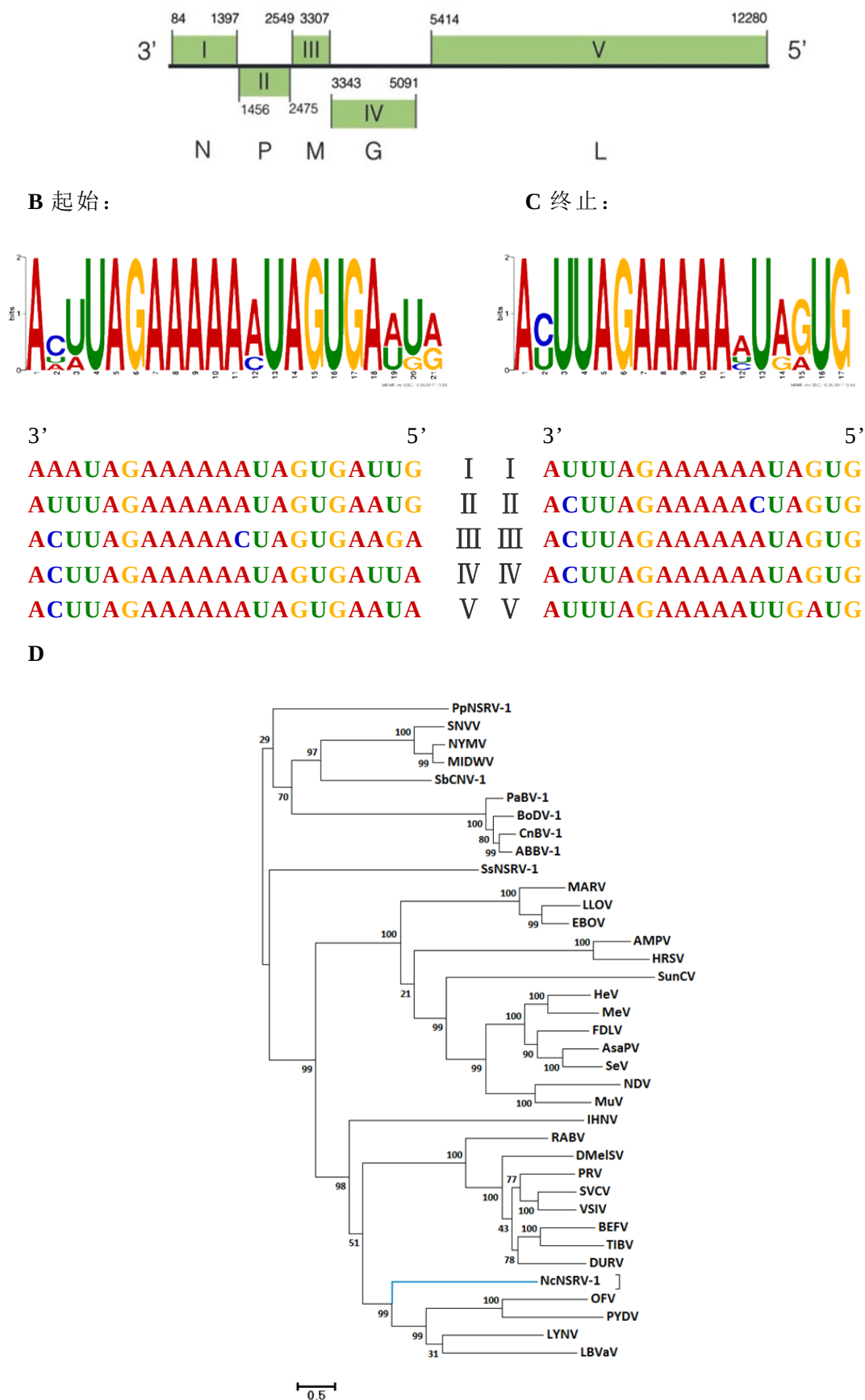


图2.2 黑尾叶蝉病毒NcNSRV-1的基因组结构

Fig.2.2 Genomic organization of NcNSRV-1

注：（A）病毒 NcNSRV-1 的基因全长和结构组成。5 个 ORF 区域分别处于不同的阅读框中，不同长度代表了各 ORF 的位置和大小，ORFV 编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, L）。（B）（C）分别为假定转录起始和假定转录中止序列。（D）为病毒 NcNSRV-1 的系统发育分析：是通过病毒 NcNSRV-1 和其它单股负链病毒的 RdRp 的核心 motif 构建的系统发生树。病毒 NcNSRV-1 的位置用蓝色标志，树上显示的是 1000 次重复后的 bootstrap 值。

Note: (A) Genome length and organization of NcNSRV-1. Each Open reading frame (ORF) is in the different frame. Boxes indicate the position and length of each ORF. ORF V encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, L). (B) Putative transcription initiation sequences. (C) Putative transcription termination sequences. (D) Phylogenetic analysis of NcNSRV-1: phylogram of the core RdRp motif of NcNSRV-1 and selected viruses from all mononegaviral families. The position of NcNSRV-1 is indicated with a blue line. Bootstrap values in 1,000 replications are shown.

2.3 讨论

在黑尾叶蝉体内发现 2 种新 RNA 病毒，即(+)ssRNA 病毒 NcPSRV-1 和(-)ssRNA 病毒 NcNSPV-1。

NcPSRV-1 全长 10,180 bp，仅有 1 个大 ORF。由于正义单链 RNA 病毒的编码结构蛋白的核酸序列通常变化较大，而编码复制蛋白的核酸序列则相对较为稳定，因此在系统进化分析时常用 RDRP 区域来进行比对。通过对不同病毒 RDRP 区域的系统进化关系分析，表明 NcPSRV-1 与流感病毒（Influenza A virus, IFV）相似性较高，同属小 RNA 病毒目传染性软腐病病毒科。目前已知的正义单链 RNA 病毒大多具有感染性，而且还是许多动植物和人类的病原体，如严重危害植物的烟草花叶病毒

(Tobacco mosaic virus, TMV)、感染家畜的口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV) 和猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV)、引发人类疾病的丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV)、脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus) 和 SARS 病毒 (Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus, SARSCoV) 等。这些病毒的结构蛋白通常能激活宿主的免疫反应。就 NcPSRV-1 而言, 尚未发现其对黑尾叶蝉有明显的致病性, 因此有关 NcPSRV-1 的生物学与生态学等特征有待进一步研究。

NcNSPV-1 全长 12,337 bp, 有 5 个 ORF 区。与正链 RNA 病毒不同, 负链病毒的 RDRP 区域核酸序列因缺乏校对体系 (Worobey 等, 1999) 而导致复制的不准确性, 即变异率较高, 其碱基突变率约为 $1/10^4$ (GmylA, 2005)。因此在系统进化分析中, 通常对较为保守的 motif 区域进行比对分析。在获得 NcNSRV-1 保守的推定转录起始序列和终止序列基础上, 通过对不同负链 RNA 病毒的 motif 序列比对, 表明 NcNSRV-1 与兰花斑点病毒 (Orchid fleck virus, OFV) 和马铃薯黄化病毒 (Potato yellow dwarf virus, PYDV) 等相似性较高, 同属单股负链 RNA 病毒目弹状病毒科。弹状病毒能感染脊椎动物、无脊椎动物和植物等。目前已知仅有果蝇 σ 病毒为昆虫病原性病毒, 在自然界只能通过亲代垂直传递, 且不能在脊椎动物体内感染和复制 (Tenings 和 Bras-Hereng, 1987)。就 NcNSRV-1 而言, 至今尚未发现其对黑尾叶蝉有明显的致病性, 因此有关 NcNSRV-1 的生物学与生态学等特征亦有待研究。

黑尾叶蝉一直因其是重要水稻病毒病原如 RDV 等的传播媒介而颇受重视。研究表明, RDV 尽管对黑尾叶蝉不具致病性, 但 RDV 可直接通过干扰叶蝉体内生理平衡或者间接通过改变水稻内环境生理条件来共同影响黑尾叶蝉的生长与繁殖, 促进叶蝉对健康稻株的传毒, 进而加剧 RDV 病害的发生与流行。本章新发现的 2 种病毒与 RDV 同属 RNA 病毒, 且能同时感染黑尾叶蝉, 因此, 这些病毒相互之间是否存在竞争或合作关系需作进一步研究。

第三章 黑尾叶蝉体内新 RNA 病毒的分布

在黑尾叶蝉体内发现 2 种新 RNA 病毒, 分别是(+)ssRNA 病毒 NcPSRV-1 和(-)ssRNA 病毒 NcNSPV-1。这两种病毒能与另一种水稻 RNA 病毒 RDV 同时存在于黑尾叶蝉体内。然而, 这 2 种新 RNA 病毒对黑尾叶蝉是否有致病性, 以及与 RDV 的关系如何均尚不明了。为此, 本章在检测新 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内时空分布的基础上, 就其在全国主要稻区的分布情况进行了检测, 同时对其他稻田叶蝉如电光叶蝉 *Inazuma dorsalis* (Motschulsky)、二点叶蝉 *Cicadulina bipunctella* (Mats)、白翅叶蝉 *Thaia rubiginosa* (Kuoh)、条沙叶蝉 *Psammotettix striatus* (L.)、小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* (Fabricius) 和大青叶蝉 *Cicadella viridis* (L.)等带毒情况作了初步分析。

3.1 材料与方法

3.1.1 试验材料

供试黑尾叶蝉于 2017 年采自浙江富阳、浙江金华、福建福州、湖北武汉、湖南长沙、江苏吴江、安徽合肥、云南昆明、广东广州、广西河池、贵州贵阳、河南信阳和河南开封等地。电光叶蝉和白翅叶蝉分别采自浙江大学紫金港校区和重庆北碚。二点叶蝉、条沙叶蝉、小绿叶蝉和大青叶蝉等采集于吉林公主岭和哈尔滨五常等地。

不同叶蝉的种群饲养同第二章 2.1.1.1。供试水稻同第二章 2.1.1.2。

3.1.2 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 的时空分布

分别取黑尾叶蝉卵、1-5 龄若虫、雌成虫和雄成虫, 并解剖黑尾叶蝉五龄若虫、雌成虫和雄成虫获取不同组织和器官, 用以检测 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉体内的时空分布情况。

取带毒的五龄若虫、雌虫、雄虫在体视解剖镜（Leica, Wetzlar, Germany）下用下解剖；获得 5 龄若虫脑、唾液腺、中肠、脂肪体及残体等、雌成虫卵巢和雄成虫唾液腺等，放入 TRIzol 试剂中，按说明书抽提 RNA，并合成 cDNA。具体操作同第二章 2.1.2.2 和 2.1.2.3。以解剖 50 个叶蝉组织或器官为 1 次重复，设 3 次生物学重复。

以 cDNA 为模板和表 3.1 中的引物，采用 SYBR premix Ex Taq™ 荧光定量 PCR 试剂盒（Takara），在 Bio-Rad CFX 96 Real-Time Detection System 定量 PCR 仪器（Bio-Rad, Hercules, CA, USA）上按说明书进行操作。具体 qPCR 体系如下所示：

SYBR® Premix Ex Taq™ II	10 μl
PCR Forward Primer	1 μl
PCR Reverse Primer	1 μl
cDNA (1000×)	2 μl
<u>ddH₂O</u>	<u>6 μl</u>
Total volum	20 μl

反应程序为：95 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 5 s，60 ℃ 35 s，72 ℃ 30 sec，40 个循环；溶解曲线（95 ℃ 10 s；65 ℃ 5 s；95 ℃ 50 s）。

反应完成后，按 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算黑尾叶蝉病毒的相对含量（Schmittgen 和 Livak, 2008）。

表 3.1 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 定量 PCR 检测的引物序列
Table 3.1 qRT-PCR primers of NcPSRV-1 in *Nephotettix cincticeps*

Primers	Oligonucleotide (5'→3')	Orientation
C57866S-1	AGTCCACCTGCTAAGATG	→
C57866A-1	GTCTCATTCCAATCACTACC	←
C57866S-2	ATTAGGAGAGAAGGGTATCG	→
C57866A-2	ATAAGCAGCGTAGGATGG	←

3.1.3 不同水稻产区叶蝉的带毒率检测

取来自不同地区的黑尾叶蝉（图 3.1）和其它叶蝉（图 3.2）的 5 龄若虫，按每头分别进行 RNA 提取（第二章 2.1.2.2）、cDNA 合成（第二章 2.1.2.3）和 PCR 检测。用于 NcNSRV-1 检测的正反向引物分别为 NcNSRV-F（1559-1578）：5'-TCG GGG TAA CAA TGT CGC AT-3'和 NcNSRV-R（2429-2452）：5'-TCA GAG TGG TGA TGT TAT CAT CGG-3'；NcPSRV-1 的分别为 NcPSRV-F（1418-1439）：5'-TGG CAC GCC TAA TAG TGT TCC T-3'和 NcPSRV-R（2197-2218）：5'-TGG TCC ACC GTT GAA ATT GAA T-3'。



图 3.1 黑尾叶蝉采集地点示意图

Fig.3.1 Collection sites of *Nephotettix cincticeps* in China



图 3.2 其它叶蝉采集地点示意图

Fig.3.1 Collection sites of other leafhoppers in China

Note:  *Empoasca flavescens*;  *Cicadulina bipunctella*;
 *Psammotettix striatus*;  *Cicadella viridis*;
 *Thaia rubiginosa*;  *Inazuma dorsalis*

PCR 反应体系如下：

cDNA	1 μ l
FP(10 μ M)	0.5 μ l
RP(10 μ M)	0.5 μ l
2X Easy-aq PCR SuperMix	10 μ l
ddH ₂ O	to 20 μ l

反应程序为：94 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环；94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环。PCR 产物分别用 1%琼脂糖凝胶电泳和测序检测，以保证产物序列的正确性。

3.1.4 数据分析

采用 DPS 14.50 软件（唐启义和冯明光，2007）对数据作统计分析，平均数的方差分析采用 Tukey 法进行显著性检验，两两比较采用 t 测验。

3.2 结果与分析

3.2.1 黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 的时空分布

利用设计 2 对引物同时对黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 进行 RT-PCR 检测，结果见图 3.3。

采用第一对引物的检测结果表明，NcPSRV-1 在黑尾叶蝉不同组织内的数量存在极显著差异（ $F_{6,14}=6.8360$ ， $p<0.01$ ，图 3.3 A），其中以唾液腺为最高，大脑、中肠、脂肪体和残体中次之，卵巢和精巢中为最低。第二对引物的检测结果与第一对引物的结果相似，NcPSRV-1 在黑尾叶蝉不同组织中含量差异达极显著（ $F_{6,14}=4.2360$ ， $p<0.01$ ，图 3.3 B），且以唾液腺和中肠中的显著为高。

对黑尾叶蝉不同发育阶段的 RT-PCR 检测结果显示，NcPSRV-1 在黑尾叶蝉各个发育阶段均能检测到，且不同发育阶段的含量无显著差异。（图 3.3 C 和 D）。

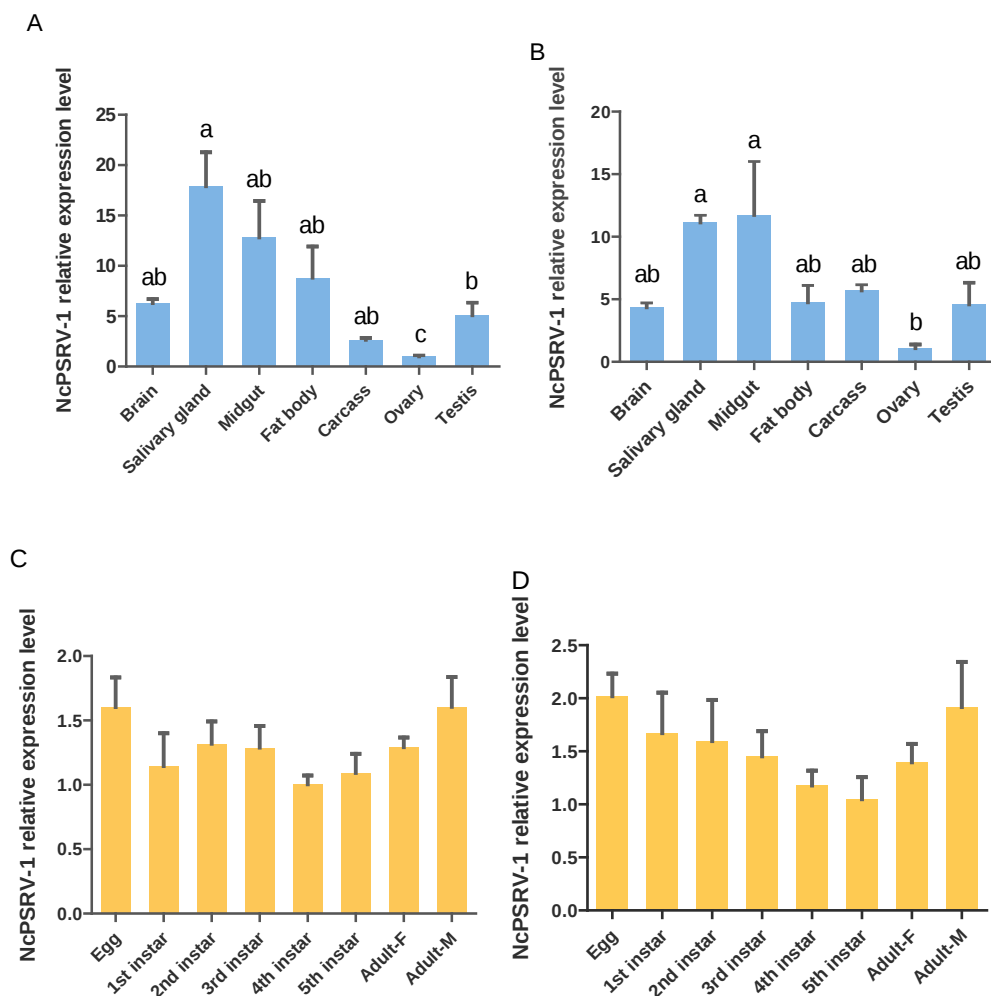


图3.3 黑尾叶蝉病毒NcPSRV-1的时空分布

Fig. 3.3 Temporal and spatial distribution of NcPSRV-1 in *Nephrotettix cincticeps*

注：（A）引物 1 检测的黑尾叶蝉各组织（大脑、唾液腺、中肠、脂肪体、残体、卵巢和精巢）中病毒分布；（B）引物 2 检测的黑尾叶蝉各组织中病毒分布；（C）引物 1 检测的黑尾叶蝉不同发育阶段（卵、1 龄、2 龄、3 龄、4 龄、5 龄、雌成虫和雄成虫）中病毒分布；（D）引物 2 检测的黑尾叶蝉不同发育阶段中病毒分布。

Note: （A）Viral load of NcPSRV-1 in different tissues (brains, salivary glands, midguts, fat body, carcass, ovaries, and testes) from *N. cincticeps* detected by qPCR primer 1; （B）Viral load of the NcPSRV-1 in different tissues in *N. cincticeps* detected by qPCR primer 2; （C）Viral load of NcPSRV-1 in different development stages (egg stage, 1st star, 2nd star, 3rd star, 4th star, 5th star, and adult stage) of *N.*

cincticeps detected by qPCR primer 1; (D) Viral load of NcPSRV-1 in different development stages of *N. cincticeps* detected by qPCR primer 2.

3.2.2 黑尾叶蝉 2 种 RNA 病毒的种类与地区分布

结果见表 3.2。

黑尾叶蝉病毒 NcNSRV-1 除在贵州贵阳种群和河南信阳种群未检测到之外，其他地区种群中均有不同数量分布（9.43-44.00%），其中以广东广州地区黑尾叶蝉的带毒率为最高。NcNSRV-1 在室内饲养一代的黑尾叶蝉带毒率与田间直接采集检测的并无明显差异。在其他稻田叶蝉体内中均未检测到病毒 NcNSRV-1。

表 3.2 黑尾叶蝉不同地区种群的带毒率检测

Table 3.2 Detection of NcNSRV-1 and NcPSRV-1 in different populations of *Nephotettix cincticeps*

Sample Location		Generation	Samples	Viruliferous rate (%)		
				NcNSRV-1	NcPSRV-1	Both
贵州贵阳	106.56°E, 26.50°N	田间当代	72	0.00	25.00	0.00
广西河池	108.05°E, 24.69°N	田间当代	40	22.50	20.00	0.00
广东广州	113.36°E, 23.12°N	室内一代	50	44.00	4.00	2.00
湖南长沙	113.62°E, 28.14°N	室内一代	48	20.83	14.58	0.00
湖北武汉	113.96°E, 30.47°N	田间当代	52	13.46	13.46	3.85
河南信阳	114.19°E, 32.01°N	室内一代	32	0.00	28.13	0.00
河南开封	114.76°E, 34.56°N	田间当代	38	13.12	7.89	0.00
安徽合肥	116.78°E, 31.72°N	室内一代	53	9.43	15.09	1.89
福建福州	119.39°E, 26.10°N	田间当代	51	19.69	13.73	1.96
浙江金华	119.64°E, 29.08°N	田间当代	38	18.42	7.89	0.00
浙江杭州	119.94°E, 30.05°N	田间当代	52	19.23	13.46	0.00

黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 在采集的各地区种群中均有分布（4.00-28.13%），其中以贵州贵阳种群和河南信阳种群的带毒率明显较高。NcPSRV-1 在室内饲养一代的黑尾叶蝉带毒率与田间直接采集检测的并无明显差异。在其他稻田叶蝉体内中均未检测到病毒 NcPSRV-1。

此外，在湖北武汉、安徽合肥、福建福州和广东广州等地区种群中，同一黑尾叶蝉体内可同时检测到这两种 RNA 病毒，表明 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 可同时感染黑尾叶蝉。

3.2.3 其他种类叶蝉 2 种 RNA 病毒带毒率检测

NcNSRV-1 检测结果见图 3.4(A), NcPSRV-1 检测结果见如 3.4(B)。

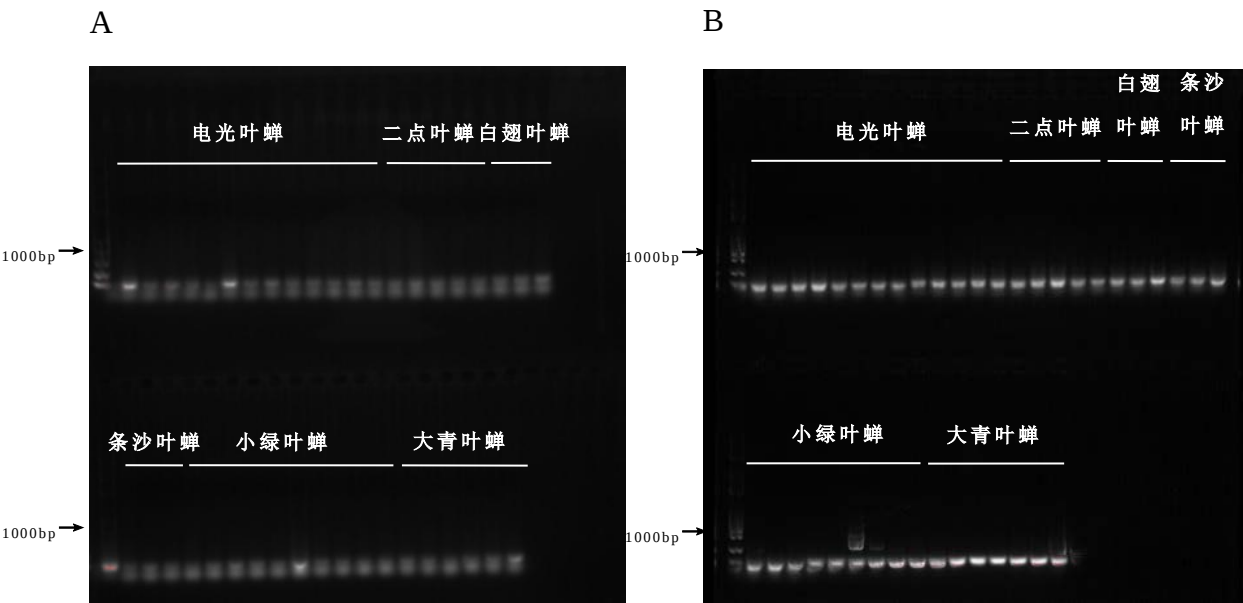


图 3.4 其他种类叶蝉两种 RNA 病毒 PCR 检测结果

Fig. 3.4 Detection of NcNSRV-1 and NcPSRV-1 in different populations of other kinds of leafhoppers

注：（A）NcNSRV-1 在其他种类叶蝉中的检测结果；（B）NcPSRV-1 在其他种类叶蝉中的检测结果。

Note: （A）Detection of NcNSRV-1 in different populations of other kinds of leafhoppers; （B）Detection of NcPSRV-1 in different populations of other kinds of leafhoppers.

在稻区采集的其他种类的叶蝉（包括电光叶蝉、白翅叶蝉、二点叶蝉、条沙叶蝉、小绿叶蝉和大青叶蝉），通过 PCR 检测结果可知，这些叶蝉并不携带两种 RNA 病毒。

3.3 讨论

黑尾叶蝉病毒 NcPSRV-1 在唾液腺和中肠中的含量较高，而在卵巢和精巢中的较少。该病毒的组织分布特点与黑尾叶蝉免疫屏障的分布较为一致。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉各个发育阶段都能被检测到，且含量无明显差异。结合平时带毒种群的饲养观察，该病毒对叶蝉似无明显的致病性，不排除为共生关系。

对采自全国 13 个水稻产区的黑尾叶蝉种群进行 RNA 病毒检测，结果显示除 NcNSRV-1 在贵州贵阳和河南信阳等地区种群中未被检测到外，NcPSRV-1 和 NcPSRV-1 在其他地区都有不同数量分布，其中以贵州贵阳种群和河南信阳种群的 NcNSRV-1 含量明显较高。在湖北武汉、安徽合肥、福建福州和广东广州等地区种群中，同一黑尾叶蝉体内可同时检测到这两种 RNA 病毒，表明 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 可同时感染黑尾叶蝉。

在吉林、哈尔滨和重庆等稻田均未能采集到黑尾叶蝉。当地稻田分别多以二点叶蝉、条沙叶蝉、大青叶蝉或白翅叶蝉等各类分布为主。对不同稻田叶蝉种类体内的带毒情况进行了检测，发现均未能检测到这 2 种 RNA 病毒。有关 2 种 RNA 病毒感染黑尾叶蝉的特异性及其地区分布的规律性，尚需对不同年份、不同地区继续采样进行检测验析。

第四章 黑尾叶蝉新 RNA 病毒与 RDV 互作的初探

在黑尾叶蝉体内新发现 2 种 RNA 病毒 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1，分别属于小 RNA 病毒目传染性软腐病病毒科和单股负链 RNA 病毒目弹状病毒科（详见第二章结果）。在平时饲养过程中，并未发现携带这 2 种病毒对黑尾叶蝉种群有明显的不利影响。结合 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉体内的时空分布结果，推测该病毒可能并不是黑尾叶蝉的病原性病毒。鉴于 2 种新 RNA 病毒是在比较 RDV 感染对唾液腺转录组变化时发现的，而且这两种病毒因黑尾叶蝉携带 RDV 而导致数量下降，表明这 3 种 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内存在互作关系。为此，本章就 3 种 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内的相互影响作了初步探索。

4.1 材料与方法

4.1.1 试验材料

供试黑尾叶蝉采自浙江杭州（120.08°E, 30.31°N），在室内连续继代饲养的健康种群和带毒种群（携带 RDV）。健康种群和带毒种群分别饲喂健康稻苗和感染 RDV 稻苗，饲养条件同第二章 2.1.1.1。

供试健康稻苗同第二章 2.1.1.2。感染 RDV 稻苗是将携带 RDV 黑尾叶蝉 3-5 龄若虫接到秧龄 7d 左右的两叶稻苗上，一虫一苗饲喂 48 h 后，将苗取出种植，出现发病症状的即为感染 RDV 的水稻。种植方法同健康水稻。

4.1.2 RDV 对黑尾叶蝉 2 种病毒带毒率的影响

从黑尾叶蝉室内饲养 1 年的带毒（RDV）种群和健康种群、以及室内饲养 3 年的健康种群中各吸取 50 只 5 龄若虫，以单头为样本提取 RNA，

并采用 RT-PCR 方法检测黑尾叶蝉对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 的带毒率。RNA 提取和 RT-PCR 检测方法同第三章 3.1.3。

4.1.3 黑尾叶蝉 2 种 RNA 病毒对 RDV 感染率的影响

分别取室内筛选获得的仅携带 NcPSRV-1（带毒率约 96.2%）的黑尾叶蝉种群 DS 和贵州贵阳种群 GY（NcPSRV-1 带毒率约 29.6%）和 2 龄若虫，接到感染 RDV 稻苗上饲喂 2 d 后，转移至健康稻苗上饲养，10 d 后采用 PCR 方法检测黑尾叶蝉感染 RDV 情况。用于 RDV 的 PCR 检测的特异性引物为 S8-F（1559-1578）：5'-TCG GGG TAA CAA TGT CGC AT-3'和 S8-R（2429-2452）：5'-TCA GAG TGG TGA TGT TAT CAT CGG-3'，而 RNA 提取和 PCR 检测体系同第三章 3.1.3。

4.1.4 数据分析

采用 DPS 14.50 软件（唐启义和冯明光，2007）对数据作统计分析，平均数的方差分析采用 Tukey 法进行显著性检验，两两比较采用 *t* 测验。

4.2 结果与分析

4.2.1 RDV 对黑尾叶蝉 RNA 病毒带毒率的影响

结果见表 4.1。黑尾叶蝉不带毒（RDV）种群在室内饲养 1 年后均能检测到 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1，其中后者的带毒率是前者的 4 倍；经过 3 年饲养后，未能检测到 NcNSRV-1，而 NcPSRV-1 的带毒率高达 90.00%。这表明 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉体内有明显的竞争优势。

在室内饲养 1 年的黑尾叶蝉带毒（RDV）种群中，仅能检测到少量携带 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 的个体，且两者带毒率无明显差异。这表明 RDV 感染后可显著抑制 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉种群中的传代，RDV 相对于这 2 种 RNA 病毒具有明显竞争优势。

表4.1 感染RDV对黑尾叶蝉2种病毒带毒率的影响

Table 4.1 Effect of RDV infection on viruliferous rates of NcNSRV-1 and NcPSRV-1 in *Nephotettix cincticeps*

Population	Number of 5th Nymphs	Viruliferous rate (%)	
		NcNSRV-1	NcPSRV-1
Non-RDV (1 yr)	50	14.00	56.00
Non-RDV (3 yrs)	50	0.00	90.00
RDV (1 yr)	48	8.33	8.33

4.2.2 黑尾叶蝉 RNA 病毒对 RDV 感染率的影响

由于 NcNSRV-1 病毒在种群饲养过程中极易丢失,因此以 NcPSRV-1 病毒开展对 RDV 感染的影响试验。结果见表 4.2。黑尾叶蝉 NcPSRV-1 低带毒率种群在饲毒后感染 RDV 叶蝉的比例为 14.80%, 而 NcPSRV-1 高带毒率种群的饲毒后感染 RDV 的个体数量为 0。这表明 NcNSRV-1 能明显影响 RDV 对黑尾叶蝉的侵染。

表4.2 黑尾叶蝉病毒NcPSRV-1对RDV感染率的影响

Table 4.2 Effect of NcPSRV-1 on infection rate of RDV in *Nephotettix cincticeps*

Populaion	Number of 5th Nymphs	Infection Rate of RDV (%)
Lab (ca. 96.2% of NcPSRV-1)	50	0.00
GY (ca. 29.6% of NcPSRV-1)	54	14.80

4.3 讨论

黑尾叶蝉 NcPSRV-1 带毒率随室内饲养时间延长而上升, 而 NcNSRV-1 带毒率却相应逐渐降低, 甚至出现丢失。有关 NcNSRV-1 丢

失的原因至今尚不明了,这还需开展相关温度试验作进一步验证。此外, NcNSRV-1 的丢失亦可能与 NcPSRV-1 的拮抗作用有关。鉴于 NcPSRV-1 为传染性软腐病毒,在室内长期饲养过程中极可能发生交叉感染,从而导致其带毒率随着饲养时间延长而上升。

黑尾叶蝉带毒(RDV)种群对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 的带毒率均相对较低,仅为 8.33%,因此推测同样为 RNA 病毒的 RDV 对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉种群中的获得与传代存在明显的抑制作用。与此相对应,感染 NcPSRV-1 后亦对 RDV 在黑尾叶蝉种群中的获得与传代存在明显的抑制作用。这表明不同的 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内存在相互的拮抗作用。其中涉及的拮抗机制尚待今后深入研究与探讨。

总结

小结与讨论

在黑尾叶蝉体内发现 2 种新 RNA 病毒 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1。采用分子克隆技术获得这 2 种病毒的基因组全序列。经过病毒基因组序列及其系统发育关系分析, (1) 明确 NcPSRV-1 是正义单链 RNA 病毒, 属小 RNA 病毒目、传染性软腐病病毒科, 基因组全长 10,180 bp, 具 1 个 ORF 区域 (261-9839), 占基因组全长的 94%; (2) 明确 NcNSRV-1 是负义单链 RNA 病毒, 属单股负链 RNA 病毒目、弹状病毒科, 基因组全长 12,337 bp, 具 5 个 ORF 区域, 其中 ORF I 为核蛋白, ORF II 因存在较多磷酸化位点而可判定为磷蛋白; ORF III 为基质蛋白; ORF IV 有信号肽, 且因有预测的 N-和 O-糖基化位点而可能是一种糖蛋白; ORF V 为聚合酶蛋白。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉唾液腺和中肠中的含量较高, 而在卵巢和精巢中较少。该病毒的这个组织分布特点与黑尾叶蝉的免疫屏障相关。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉各个发育阶段都能被检测到, 且含量无明显差异, 结合平时带毒种群饲养观察, 推测该病毒对叶蝉并无致病性, 可能为共生关系。

在进行全国带毒率分布检测中发现, NcNSRV-1 在黑尾叶蝉广东广州种群中的带毒率明显较高, 而在贵州贵阳种群和河南信阳种群中未能检测到。NcPSRV-1 在黑尾叶蝉不同地区种群均有分布, 其中却是以广东广州种群中的带毒率为最低, 而在在贵州贵阳种群和河南信阳种群中的带毒率为最高。此外, 在湖北武汉、安徽合肥、福建福州和广东广州等地区种群中, 同一黑尾叶蝉体内可同时检测到这 2 种 RNA 病毒。这表明 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1 可同时感染黑尾叶蝉, 但比例较低。由此推测 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1 在黑尾叶蝉体内亦可能存在竞争拮抗作用。

NcPSRV-1 在黑尾叶蝉种群中的带毒率随室内饲养时间延长而上升, 而 NcNSRV-1 正相反, 其带毒率逐渐降低, 甚至丢失。有关 NcNSRV-1

丢失的原因至今尚不明了。此外, NcNSRV-1 的丢失亦可能与 NcPSRV-1 的拮抗作用有关。鉴于 NcPSRV-1 为传染性软腐病毒, 在室内长期饲养过程中极可能发生交叉感染, 从而导致其带毒率随着饲养时间延长而上升。

黑尾叶蝉带毒 (RDV) 种群对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 的带毒率均相对较低, 因此推测同样为 RNA 病毒的 RDV 对 NcNSRV-1 和 NcPSRV-1 在黑尾叶蝉种群中的获得与传代存在明显的抑制作用。与此相对应, 感染 NcPSRV-1 后亦对 RDV 在黑尾叶蝉种群中的获得与传代存在明显的抑制作用。这表明不同的 3 种 RNA 病毒在黑尾叶蝉体内存在相互的拮抗作用。其中涉及的拮抗机制尚待今后深入研究与探讨。

在其他稻田叶蝉中并未检测到 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1。由于限于检测的样本数, 因此现有的检测结果似不足以证明这 2 种 RNA 病毒为黑尾叶蝉特有。研究结果表明, 传染性软腐性病毒多具有专一性宿主, 如柞蚕软化病毒 (*Antheraea pernyi* iflavirus, ApIV)、榕透翅毒蛾病毒 (*Perina nuda* virus, PnV) 和意蜂囊状幼虫病病毒 (*Sacbrood* virus, SBV) 等 (van Oer, 2010)。结合现今未有 NcPSRV-1 在其他叶蝉上的相关报道, 因此推测 NcPSRV-1 可能为黑尾叶蝉的专有病毒。

如今在半翅目昆虫上发现的昆虫 RNA 病毒主要集中在双顺反子病毒科 Dicistroviridae, 传染性软腐病病毒科 Iflaviridae, 弹状病毒科 Rhabdoviridae, 呼肠孤病毒科 Revoviridae。弹状病毒分布广泛, 且多为虫媒传播, 如北方禾谷花叶病毒 (Northern cereal mosaic virus, NCMV) 和大麦黄条点花叶病毒 (Barley yellow striate mosaic rhabdo virus, BYSMRV) 等经灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 传播, 美洲小麦条点花叶病毒 (American wheat striate mosaic virus, AWSMV) 经叶蝉传播。然而, 在水稻上并未能检测到 NcNSRV-1 病毒, 据此推测该病毒不是虫媒病毒。其他昆虫弹状病毒如黑腹果蝇西格马病毒 (*Drosophila melanogaster* sigmavirus) 可通过精卵垂直传播, 并具有宿主特异性 (Dietzgen 和 Kuzmin, 2012)。因此, NcNSRV-1 也可能是黑尾叶蝉所特有。

如果这 2 种 RNA 病毒都为黑尾叶蝉所特有，且能抑制水稻 RDV 病毒在黑尾叶蝉体内的复制与增殖，则可利用不同 RNA 病毒的互作机制来防治虫传植物病毒的传播与流行。这为开发水稻叶蝉及其传播的病毒病防控新技术和新策略提供了新思路。

创新之处

(1) 在黑尾叶蝉体内鉴定获得 2 种新 RNA 病毒 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1，在解析病毒全基因组序列基础上，明确了这 2 种 RNA 病毒的分类地位；

(2) 对 15 个国内水稻主产区的黑尾叶蝉等进行采集与检测，明确了 NcPSRV-1 和 NcNSRV-1 的田间自然分布情况；

(3) 初步探讨了媒介昆虫体内的昆虫病毒与植物病毒 RDV 之间的互作关系，为开发水稻叶蝉及其传播的病毒病防控新技术和新策略提供了基础。

不足之处及今后研究方向

(1) 2 种新 RNA 病毒的形态结构观察需要进一步研究；

(2) 在田间采集并筛选获得 NcNSRV-1 高携带率种群；

(3) 系统研究 2 种 RNA 病毒对黑尾叶蝉生物学、生理学、行为学和生态学等方面的影响；

(4) 2 种 RNA 病毒之间以及与 RDV 之间的互作机制尚待进一步探索。

参考文献

- [1] 童清, 彭辉银. (2009). 应用带病毒的松毛虫赤眼蜂防治思茅松毛虫的研究. *西部林业科学*, 38(3), 102-105.
- [2] 吕鸿声. (1998). 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社, 1-15.
- [3] Agaisse, H., & Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological reviews*, 198(1), 72-82.
- [4] Avadhanula, V., Weasner, B.P., Hardy, G.G., Kumar, J.P., & Hardy, R.W. (2009). A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS pathogens*, 5(9), e1000582.
- [5] Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L. *et al.* (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- [6] Baker, T.S. (2003). Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nature Structural Biology*, 10(12), 1011-1018.
- [7] Ban, L., Ahmed, E., Ninkovic, V., Delp, G., & Glinwood, R. (2008). Infection with an insect virus affects olfactory behaviour and interactions with host plant and natural enemies in an aphid. *Entomologia experimentalis et applicata*, 127(2), 108-117.
- [8] Bao, Y., Chetvernin, V. & Tatusova, T. (2014). Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification. *Arch. Virol*, 159, 3293-3304.
- [9] Beutler, B., Eidenschenk, C., Crozat, K., Imler, J.L., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., & Akira, S. (2007). Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 753.
- [10] Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol*, 294, 1351-1362.
- [11] Boyce, M., Wehrfritz, J., Noad, R., & Roy, P. (2004). Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *Journal of virology*, 78(8), 3994-4002.
- [12] Chambers, T.J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C.M. (1989). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu.rev.microbiol*, 44(1), 649.
- [13] Chotkowski, H.L., Ciota, A.T., Jia, Y., Puig-Basagoiti, F., Kramer, L.D., Shi, P.Y., & Glaser, R.L. (2008). West Nile virus infection of *Drosophila melanogaster* induces a protective RNAi response. *Virology*, 377(1), 197-206.
- [14] Chung, H.K., Kordyban, S., Cameron, L., & Dobos, P. (1996). Sequence analysis of the bicistronic *Drosophila* X virus genome segment A and its encoded polypeptides. *Virology*, 225(2), 359-368.
- [15] Cock, J., Yoshida, S., & Forno, D. A. (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice. *Int. Rice Res. Inst.*

- [16] Condit, R. C. (2013). Principles of Virology. In: Knipe, D. M., & Howley, P. M. (eds.) Fields virology (6th Ed.), Vol I, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 21-51.
- [17] Contamine, D. (1981). Role of the Drosophila genome in Sigma virus multiplication I. Role of the ret (2) P gene; Selection of host-adapted mutants at the nonpermissive allele Pp. *Virology*, 114(2), 474-488.
- [18] Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., & Schneider, D. (2009). The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in Drosophila. *PloS one*, 4(10), e7436.
- [19] Cowley, J.A., Dimmock, C.M., & Walker, P.J. (2002). Gill-associated nidovirus of penaeus monodon prawns transcribes 3'-coterminial subgenomic mrnas that do not possess 5'-leader sequences. *Journal of General Virology*, 83(4), 927-935.
- [20] Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., & Imler, J.L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nature immunology*, 9(12), 1425.
- [21] Dheilly, N. M., Maure, F., Ravallec, M., Galinier, R., Doyon, J., & Duval, D., *et al.* (2015). Who is the puppet master? replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proc Biol Sci*, 282(1803), 20142773.
- [22] Dietzgen, R.G., Kuzmin, V.I. (2012). Rhabdoviruses: Molecular taxonomy, evolution genemics, ecology, Host - Vector interactions, cytopathology and control. *Norfolk: Caister Academic Press*, 1-269.
- [23] Durdevic, Z., Hanna, K., Gold, B., Pollex, T., Cherry, S., Lyko, F., & Schaefer, M. (2013). Efficient RNA virus control in Drosophila requires the RNA methyltransferase Dnmt2. *EMBO reports*, 14(3), 269-275.
- [24] Ferrero, D. S., Buxaderas, M., Rodríguez, J.F., & Verdaguer, N. (2015). The structure of the rna-dependent rna polymerase of a permutotetravirus suggests a link between primer-dependent and primer-independent polymerases. *Plos Pathogens*, 11(12), e1005265.
- [25] Fitzgerald, K.A., & Chen, Z.J. (2006). Sorting out Toll signals. *Cell*, 125(5), 834-836.
- [26] Fleuriet, A. (1980). Polymorphism of the hereditary sigma virus in natural populations of Drosophila melanogaster. *Genetics*, 95(2), 459-465.
- [27] Gall, O.L., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M.Q., Knowles, N.J., & Nakashima, N., *et al.* (2008). Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded rna viruses with a pseudo-t=3 virion architecture. *Archives of Virology*, 153(4), 715.
- [28] Garrey, J.L., Lee, Y.Y., Au, H.H., Bushell, M., & Jan, E. (2010). Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *Journal of virology*, 84(2), 1124-1138.
- [29] Gaunt, M.W., Sall, A.A., De, L.X., Falconar, A.K., Dzhivanian, T.I., & Gould, E.A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General*

- Virology*, 82(8), 1867-76.
- [30]Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479-480, 356-368.
- [31]Glaser, R.L., & Meola, M.A. (2010). The native Wolbachia endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PloS one*, 5(8), e11977.
- [32]Gmyl', A. P., & Agol, V. I. (2005). Variable mechanisms of rna-recombination. *Molekuliarnaia Biologiya*, 39(4), 618.
- [33]Gorbalenya, A.E., Pringle, F.M., Zeddam, J.L., Luke, B.T., Cameron, C.E., & Kalkmakoff, J., *et al.* (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral rna-dependent rna polymerases of an ancient lineage. *Journal of Molecular Biology*, 324(1), 47-62.
- [34]Habayeb, M., & Ekengrent, S.D. (2006). Nora virus, a persistent virus in *drosophila*, defines a new picorna-like virus family. *Journal of General Virology*, 87(10), 3045-51.
- [35]Hedges, L.M., & Johnson, K.N. (2008). Induction of host defence responses by *Drosophila* C virus. *Journal of General Virology*, 89(6), 1497-1501.
- [36]Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H. (2008). How many species are infected with Wolbachia?—a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 215-220.
- [37]Houte, S.V., Ros, V.I.D., & Oers, M.M.V. (2013). Walking with insects: molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. *Molecular Ecology*, 22(13), 3458-75.
- [38]Huang, Z., Kingsolver, M.B., Avadhanula, V., & Hardy, R.W. (2013). An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. *Journal of virology*, 87(8), 4272-4280.
- [39]Jeyaprakash, A., & Hoy, M.A. (2000). Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty - three arthropod species. *Insect molecular biology*, 9(4), 393-405.
- [40]Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res*, 35, W429-432.
- [41]King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens E B. (2012). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press, New York*.
- [42]Koonin, E.V., Dolja, V.V., & Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. *Virology*, 479, 2-25.
- [43]Koonin, E.V., Wolf, Y.I., Nagasaki, K., & Dolja, V.V. (2008). The big bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 925-939.
- [44]Krupovic, M., & Bamford, D. H. (2008). Virus evolution: how far does the double beta-barrel viral lineage extend? *Nature Reviews Microbiology*, 6(12),

- 941-948.
- [45]Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., & Nga, P. T., *et al.* (2012). Mesoniviridae: a proposed new family in the order nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Archives of Virology*, 157(8), 1623-1628.
- [46]Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*, 25, 697-743.
- [47]Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
- [48]Liu, S., Vijayendran, D., & Bonning, B.C. (2011). Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. *Viruses*, 3(10), 1849-69.
- [49]Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2405-2419.
- [50]Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., & Thompson, C.B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(6), 439.
- [51]Maciel-Vergara, G., & Ros, V. I. D. (2017). Viruses of insects reared for food and feed. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 60-75.
- [52]Magyar, G., Chung, H.K., & Dobos, P. (1998). Conversion of VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 245(1), 142-150.
- [53]Maure, F., Daoust, S.P., Brodeur, J., Mitta, G., & Thomas, F. (2013). Diversity and evolution of bodyguard manipulation. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 36-42.
- [54]Maynard, C.L., Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y., & Weaver, C.T. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature immunology*, 8(9), 931.
- [55]Mueller, S., Gausson, V., Vodovar, N., Deddouche, S., Troxler, L., Perot, J., & Imler, J. L. (2010). RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19390-19395.
- [56]Nakamoto, M., Moy, R.H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S.S., & Cherry, S. (2012). Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity*, 36(4), 658-667.
- [57]Nayak, A., Berry, B., Tassetto, M., Kunitomi, M., Acevedo, A., Deng, C., & Andino, R. (2010). Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(5), 547.
- [58]Nezis, I.P., Simonsen, A., Sagona, A.P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., & Brech, A. (2008). Ref (2) P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult

- brain. *The Journal of cell biology*, 180(6), 1065-1071.
- [59]Nga, P.T., Parquet, C.M., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., & Yu, F., *et al.* (2011). Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest rna virus genomes. *Plos Pathogens*, 7(9), e1002215.
- [60]Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., & Celle, O., *et al.* (2008). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Research*, 132(1), 59-68.
- [61]Ortín, J., & Martínbenito, J. (2015). The rna synthesis machinery of negative-stranded rna viruses. *Virology*, s 479–480, 532-544.
- [62]Österlund, P.I., Pietilä, T.E., Veckman, V., Kotenko, S.V., & Julkunen, I. (2007). IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3434-3442.
- [63]Österlund, P.I., Pietilä, T.E., Veckman, V., Kotenko, S.V., & Julkunen, I. (2007). IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3434-3442.
- [64]Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.B., & Walker, P.J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in Culex mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18915-18920.
- [65]Peiris, J.S., Lai, S.T., Poon, L.L., Guan, Y., Yam, L.Y., & Lim, W., *et al.* (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 361(9366), 1319-1325.
- [66]Powers, A., Huang, H., Roehrig, J., King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*, New York, pp, 1103-1110.
- [67]Ramadevi, N., Burroughs, N.J., Mertens, P.P., Jones, I.M., & Roy, P. (1998). Capping and methylation of mRNA by purified recombinant VP4 protein of bluetongue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13537-13542.
- [68]Ramirez, J.L., & Dimopoulos, G. (2010). The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse Ae. aegypti strains and against multiple dengue virus serotypes. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(6), 625-629.
- [69]Ribi  re, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Auri  res, C., Faucon, J.P., & P  pin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie*, 33(3), 339-351.
- [70]Roxstr  m - Lindquist, K., Terenius, O., & Faye, I. (2004). Parasite - specific immune response in adult Drosophila melanogaster: a genomic study. *EMBO reports*, 5(2), 207-212.
- [71]Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., & Andino, R., *et al.* (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, nosema, and crithidia. *Plos*

- One*, 6(6), e20656.
- [72] Ryabov, E. V. (2017). Invertebrate RNA virus diversity from a taxonomic point of view. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 37-50.
- [73] Rytte, A., Morelli, S., Mazzei, M., Alama, A., Franco, P., & Canti, G.F., *et al.* (1993). Oligonucleotide degradation contributes to resistance to antisense compounds. *Anti-cancer drugs*, 4(2), 197.
- [74] Sabin, L.R., Hanna, S.L., & Cherry, S. (2010). Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Current opinion in immunology*, 22(1), 4-9.
- [75] Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- [76] Schuster, S., Zirkel, F., Kurth, A., Cleef, K.W.R.V., Drosten, C., & Rij, R.P.V., *et al.* (2014). A unique nodavirus with novel features: mosinovirus expresses two subgenomic rnas, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral rna interference pathway. *Journal of Virology*, 88(22), 13447-13459.
- [77] Shan, L., Liuhaio, W., Jun, G., Yujie, T., Yanping, C., Jie, W., & Jilian, L. (2017). Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of invertebrate pathology*, 150, 63-69.
- [78] Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., & Cherry, S. (2009). Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity*, 30(4), 588-598.
- [79] Shi, M., Lin, X.D., Tian, J. H., Chen, L. J., Chen, X., Li, C. X., Qin, X. C., Li, J., Cao, J. P., Eden, J. S., Buchmann, J., Wang, W., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540, 539-543.
- [80] Shwed, P.S., Dobos, P., Cameron, L.A., Vakharia, V.N., & Duncan, R. (2002). Birnavirus vp1 proteins form a distinct subgroup of rna-dependent rna polymerases lacking a gdd motif. *Virology*, 296(2), 241-250.
- [81] Sparks, W.O., Bartholomay, L.C., & Bonning, B.C. (2008). Insect immunity to viruses. *Insect immunology*, 209-242.
- [82] Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T. *et al.* (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32, 1478-1488.
- [83] Suzuki, N., Watanabe, Y., Kusano, T., & Kitagawa, Y. (1989). Nucleotide sequence of rice dwarf virus segment 5. *Nucleic Acids Research*, 17, 8858.
- [84] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*, 28, 2731-2739.
- [85] Tang, Q.Y., & Zhang, C.X. (2013). Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2), 254-260.
- [86] Tao, Y.J., & Ye, Q. (2010). Rna virus replication complexes. *Plos Pathogens*,

- 6(7), e1000943.
- [87] Teixeira, L., Ferreira, Á., & Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6(12), e1000002.
- [88] Teninges, D., Bras-Hereng, F. (1987). Rhabdovirus *sigma*, the hereditary CO₂ sensitivity agent of *Drosophila*: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the glycoprotein. *Journal of General Virology*, 68 (Pt 10), 2625-2638.
- [89] Valles, S.M., & Hashimoto, Y. (2009). Isolation and characterization of solenopsis invicta virus 3, a new positive-strand rna virus infecting the red imported fire ant, solenopsis invicta. *Virology*, 388(2), 354-361.
- [90] Valles, S.M., Bell, S., & Firth, A.E. (2014). Solenopsis invicta virus 3: mapping of structural proteins, ribosomal frameshifting, and similarities to acyrthosiphon pisum virus and kelp fly virus. *Plos One*, 9(3), e93497.
- [91] Van Mierlo, J.T., Bronkhorst, A.W., Overheul, G.J., Sadanandan, S.A., Ekström, J.O., Heestermans, M., & Van Rij, R.P. (2012). Convergent evolution of argonaute-2 slicer antagonism in two distinct insect RNA viruses. *PLoS pathogens*, 8(8), e1002872.
- [92] Van Oers, M. M. (2010). Genomics and biology of Iflaviruses. *Insect Virology. Caister Academic Press, Norfolk*, 231-250.
- [93] Van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., & Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & development*, 20(21), 2985-2995.
- [94] Walker, P. J., Dietzgen, R. G., Joubert, D. A., & Blasdel, K. R. (2011). Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research*, 162(1-2), 110.
- [95] Wang, F., Fang, Q., Wang, B., Yan, Z., Hong, J., & Bao, Y., *et al.* (2017). A novel negative-stranded rna virus mediates sex ratio in its parasitoid host. *Plos Pathogens*, 13(3), e1006201.
- [96] Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., & Ding, S.W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*, 312(5772), 452-454.
- [97] Whitfield, J.B. (1998). Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual review of entomology*, 43(1), 129-151.
- [98] Williams, T., Bergoin, M., van Oers, M. M. (2017). Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 4-22.
- [99] Worobey, M., & Holmes, E.C. (1999). Evolutionary aspects of recombination in rna viruses. *Journal of General Virology*, 80 (Pt 10)(80 (Pt 10)), 2535.
- [100] Xi, Z., Ramirez, J.L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens*, 4(7), e1000098.
- [101] Zambon, R.A., Vakharia, V.N., & Wu, L.P. (2006). RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular microbiology*, 8(5), 880-889.

-
- [102]Zeddarn, J.L., Gordon, K.H., Lauber, C., Alves, C.A., Luke, B.T., & Hanzlik, T.N., *et al.* (2010). Euprosterna elaeasa virus genome sequence and evolution of the tetraviridae family: emergence of bipartite genomes and conservation of the vpg signal with the dsrna birnaviridae family. *Virology*, 397(1), 145.
- [103]Zirkel, F., Roth, H., Kurth, A., Drosten, C., Ziebuhr, J., & Junglen, S. (2013). Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family mesoniviridae. *Journal of Virology*, 87(11), 6346.