

小麦黄色花叶病毒 RNA2 自然缺失突变体的筛选和定位分析

张卫华, 杨 军, 韩成贵, 李大伟, 于嘉林

(中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室和植物病理学系, 北京 100094)

摘要: 许多真菌介体传播的病毒在机械接种过程中易于发生自然缺失。利用在小麦上连续机械接种 WYMV 的方法, 自第 27 代起, 利用 RT-PCR 和 Northern blot 方法在感病小麦中检测到一个 WYMV RNA2 的缺失突变株, 序列分析发现缺失区域位于 RNA2 的 214~2 808 nt, 共计 2 595 nt, 并在缺失区域的两端存在 7 个碱基的反向互补序列。缺失区域上游紧邻这 7 个碱基双链区存在一富含 AU 的短序列, 并据此对此 D-RNA2 的缺失机制进行了讨论。

关键词: WYMV; 机械接种; RNA2 缺失突变株

中图分类号: S432.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)01-0080-06

Location of Spontaneously Deleted Region of Wheat Yellow Mosaic Virus RNA2 in Inoculated Wheat

ZHANG Wei-hua, YANG Jun, HAN Cheng-gui, LI Da-wei, YU Jia-lin

(Department of Pathology and State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China

Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Fungus-transmitted plant viruses are liable to naturally delete some internal sequences from their genomes in infected plants during repeated mechanical passages. In this paper, a deleted mutation in RNA2 of WYMV was detected after the 27 passage of mechanical inoculation in wheat by RT-PCR and Northern blot. Sequence analysis showed that a contiguous sequence of 2 595 nucleotides (from nt 214 to nt 2 808) was internally deleted from WYMV RNA2 and flanked by seven reverse repeated compatible nucleotides which can form a loop-stem structure. A short sequence rich of base A (or U) connect to the left deleted region, which is the deletion signal in many viruses. The possible mechanism of the generation of deleted RNA2 of WYMV is discussed.

Key words: WYMV; Repeated mechanical passages; Location of spontaneously of RNA2

小麦黄花叶病在我国南部冬小麦种植区分布十分广泛, 已经遍及长江流域各省份以及河南、陕西等省, 对小麦生长、发育及产量造成严重危害^[1~3]。其病原小麦黄色花叶病毒 (Wheat yellow mosaic virus, WYMV) 是一种由根肿菌目多黏菌属的禾谷多黏菌 (*Polymyxa graminis*) 传播的二分体正链 RNA 病毒, 病毒基因组含有两个 RNA 组分, 并已明确了许多分离物的全序列, RNA1 全长 7 644 个核苷酸, RNA2 由 3 651 核苷酸组成, 分类上归属于马铃薯 Y 病毒科

(Potyviridae)、大麦黄花叶病毒属 (*Bymovirus*)^[4,5]。

环境选择压力的改变, 往往能导致 RNA 病毒基因的迅速变异, 包括基因组的内部缺失或重组, 形成缺损型 RNA。这类 RNA 分子必须依赖于其辅助病毒才能复制, 并可能在侵染寄主植物的过程中影响辅助病毒的积累, 或改变辅助病毒的致病性。根据以往的报道, 许多真菌传植物病毒在寄主体内普遍存在自发缺失体, 经连续机械接种后尤为明显, 并可能伴随更为严重的症状^[6~8]。杨军等人报道^[9], WYMV 潢川分离物连续继代机械接种感病小麦品种鄂恩 1 号, 高代次

收稿日期: 2005-11-13

基金项目: 国家 973 项目 (G2000016201); 国家自然科学基金项目 (39870028)

作者简介: 张卫华 (1970-), 女, 山东烟台人, 在读博士, 主要从事植物分子病毒学研究工作; 韩成贵为通讯作者。

WYMV 感染小麦叶片的效率明显提高, 症状加重, 序列分析发现了一种内部缺失型的 RNA1 分子。在此基础上, 本研究通过继代机械接种的方法侵染小麦, 鉴定了一种 WYMV RNA2 上的内部缺失突变体。对这些突变体 RNAs 的比较研究, 有可能为揭示 WYMV 基因在真菌传播过程中的功能提供一些新的启示。

1 材料和方法

1.1 毒源与受试品种

供 WYMV 接种的感病小麦品种为鄂恩 1 号。

感染 WYMV 的小麦样品采于河南省潢川县。采集具有明显黄花叶症状的新鲜小麦叶片用于病毒机械接种, 其余保存于 -80 °C 冰箱中, 接种的继代的感病小麦材料同样保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2 WYMV 的人工机械接种

1.2.1 接种方法 将小麦种子播种在盛有灭菌沙土的花盆中(每盆 20~25 粒), 28 °C 左右培养出苗, 转入 13~14 °C 光照培养箱培养至一叶, 高约 5 cm; 取发病叶片, 剪碎后加入适量的 0.02 mol/L 的 PB (pH 7.0) 和适量的金刚砂研磨成匀浆; 在待接种的

小麦叶片上喷洒金刚砂, 然后蘸取病叶汁液进行叶部摩擦接种, 接种力度要大, 至小麦接种部位似有汁液渗出。接种 5 min 后用清水轻微冲洗; 接种后的小麦先放在 18~20 °C 暗培养 1 d, 随后转入 12~13 °C 低温条件下培育(光照 16 h/d)。1~2 d 浇一次 Adams 营养液, 保持沙子呈半干半湿状态。观察小麦 WYMV 症状的发展。

1.2.2 继代接种 以田间的病叶(P₀)接种后的发病小麦为第 1 代(P₁), 再用 P₁ 接种的发病小麦为第 2 代(P₂), 依此类推。持续进行病毒的继代摩擦接种。按每盆苗 0.1 g 取接种小麦发病叶, 加入 1 mL PB 后研磨用于继代机械接种。

1.3 载体和菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 株由本实验室保存; 质粒载体 pUCm-T 购自 Sangon 公司。

1.4 寡聚核苷酸引物

根据报道的 WYMV 潢川分离物 RNA2 核苷酸序列(Genbank 登录号为 AF067124)设计合成下列引物^[1]在 WYMV 基因组 RNA2 上的相对位置见图 1。

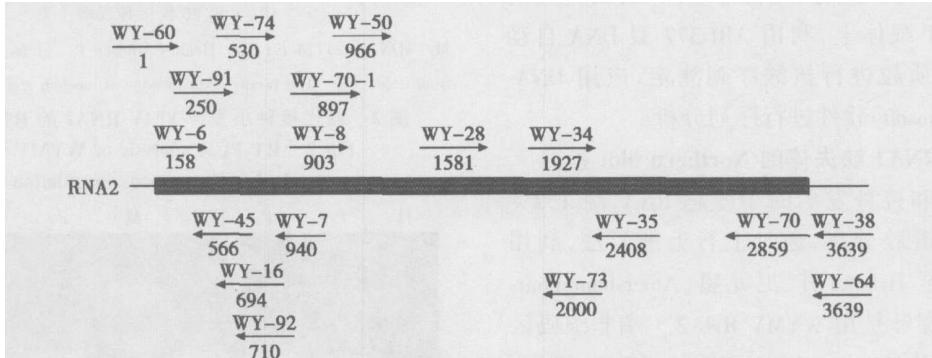


图 1 部分引物在 WYMV RNA2 上的相对位置

Fig 1 Location of the synthesized primers on WYMV RNA2

WY-6: 5'-TTTCCAGTACTATGGCATCCACCAG-3' 与 RNA2 的 158~173 nt 对应; WY-7: 5'-GGCCTG-GATCCTCAGCTCAGCCGAC-3' 与 RNA2 的 940~915 nt 互补; WY-8: 5'-CTCAACCATATGGTCGGCTCAGCT GAGG-3' 与 RNA2 的 903~931 nt 对应; WY-16: 5'-CGGCTACTGCTATCTGAAC-3' 与 RNA2 的 694~676 nt 互补; WY-28: 5'-TCTCTCAGCATGGTGGCAGG-3' 与 RNA2 的 1581~1600 nt 对应; WY-34: 5'-CAAGCAGT-CATTCCAGAGCA-3' 与 RNA2 的 1927~1947 nt 对应; WY-35: 5'-CATTAGCAAGCAGCGAGACA-3' 与 RNA2 的 2408~2388 nt 互补; WY-38: 5'-GTCACATTTCCT-GTGTAACAAAAG-3' 与 RNA2 的 3639~3616 nt 互补; WY-45: 5'-TTAAAAGCAATGAAGGTTTCG-3' 与 RNA2 的

566~547 nt 互补; WY-50: 5'-TGACCACTGGATTA-CAAGCAGG-3' 与 RNA2 的 966~987 nt 对应; WY-64: 5'-CGGGATCCC/GGG (T)26GTCACA TTTCCTGTGTA-CAA-3' 与 RNA2 的 3639~3616 nt 互补; WY-60: 5'-CGGGATCCTGCAGTAATACGACTCACTATAGAAAATA AAACCACCACAA-3' RNA2 5' 端引物; WY-70-1: 5'-TGAATCCTCCCCGGGATTC-3' 与 RNA2 的 897~916 nt 对应; WY-73: 5'-GTGTAGAAACCAGATCCATGGG-3' 与 RNA2 的 1979~2000 nt 互补; WY-70-2: 5'-GAAACTAATGCCCGGGCCT-3' 与 70 KD 的 3' 端互补; WY-74: 5'-CGAGATTACAACC AGTCCGAAC-3' 与 RNA2 的 530~551 nt 对应; WY-80: 5'-CATTTGCT-CATTTCGCACCT-3' 与 RNA2 的 2891~2909 nt 对应;

WY-81: 5'-CGGGATCCATGGTCGCTCGGCTCAGCTGAGGAAAC-3'与 RNA2 的 903~922 nt 对应; WY-91: 5'-ACTAGGGACGCTCTGCCACAGC-3'与 RNA2 的 250~270 nt 对应; WY-92: 5'-CCAAGCGTTGGATATGCGCCA-3'与 RNA2 的 690~710 nt 互补。

1.5 小麦黄色花叶病毒 RNA2 RT-PCR 检测

首先提取发病小麦的总 RNA。以 2~3 μg 总 RNA 为模板,在 30 μL 反应体系中含有 200 U 的 M-MLV 逆转录酶,50 U 的 RNasin,3 μL 0.1 mol DTT。1 μL 10 mmol dNTPs 和 1 μg 3'端引物,42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1.5~2 h。以 2 μL 的反转录产物为模板,在 50 μL 的反应体系中含有 5 U Taq DNA 聚合酶、上下游引物各 0.1 μg 和 1 μL 5 mmol dNTPs,进行 PCR 扩增。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2~3 min,30~35 个循环。复性温度根据所用引物的 T_m 值确定,延伸时间根据所扩增片段的长度确定(1 kb/min)。

1.6 WYMV RNA2 缺失体的克隆与序列分析

以感病接种小麦总 RNA 为模板,扩增获得的小片段 RT-PCR 产物,经抽提回收后,用 T4DNA 连接酶连接到 pUCm-T 载体上,利用 ABI-377 型 DNA 自动测序仪对重组质粒进行核酸序列测定,应用 DNA-MAN (Lynnon Biosoft) 软件进行序列分析。

1.7 WYMV RNA2 缺失体的 Northern blot 检测

提取病田和接种发病的小麦总 RNA,经 1.2% 非变性琼脂糖凝胶分离,通过上行毛细管法,利用 20 \times SSC 转移至 Hybond-H⁺ 尼龙膜 (Amersham Pharmacia 公司)。探针是用 WYMV RNA2 3'端非编码区 cDNA 片断 (引物对 WY-80/WY-38 扩增产物,0.7Kb),采用随机引物试剂盒并按 Promega 厂家提供的方法,用 α -³²P-dCTP 进行同位素标记作为特异探针进行 Northern blot 检测分析。

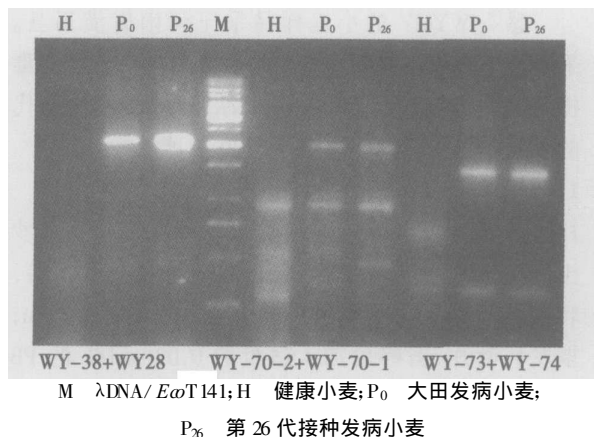
2 结果与分析

2.1 WYMV 缺失型 RNA2(D-RNA2)的 RT-PCR 检测

用 WYMV 潢川分离物连续继代机械接种后,提取发病小麦叶片总 RNA 作为模板,RT-PCR 扩增检测 WYMV 在继代接种过程中可能发生的内部缺失。所用引物对涵盖了整个 WYMV RNA2 基因组 (图 1),同时以健康小麦总 RNA 为阴性对照,大田发病小麦 (P_0) 或继代接种一次的发病小麦 (P_1) 为阳性对照。结果显示,利用不同的引物对分段扩增整个基因组时,只扩增出预期长度的产物片段,而未发现特

异性小的缺失片段产生 (图 2)。

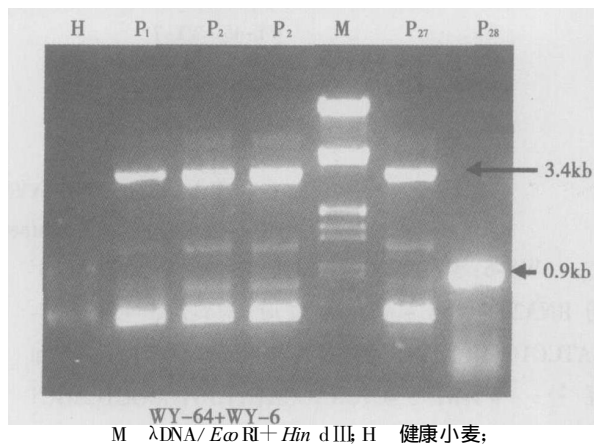
但是当使用与 WYMV 3', 5' 端配对的引物 WY38/WY-6 或 WY64/WY-6 进行扩增时,在第 28 代 (P_{28}) 发病小麦中可以扩增得到一个约 900 bp 的缺失型条带,而在继代接种第 1 代的发病小麦 (P_1)、继代接种第 2 代的发病小麦 (P_2)、继代接种第 27 代 (P_{27}) 的发病小麦中则扩增出一个约 3.4 kb 的条带,与理论值相符 (图 3)。后来在 P_{27} 、 P_{32} 和 P_{33} 的接种材料中也同样检测到了缺失片段的产生,而在其他低代次样品内尚未检测到缺失型 RNA2。



M λ DNA/ *Eco*T141; H Healthy wheat; P_0 Infected wheat collected from field; P_{26} The twenty-sixth passage of mechanical inoculation

图 2 继代接种小麦 WYMV RNA2 的 RT-PCR 检测

Fig 2 RT-PCR analysis of WYMV RNA2 during the passage inoculation



P_1 第 1 代接种发病小麦; P_2 第 2 代接种发病小麦;

P_{27} 第 27 代接种发病小麦; P_{28} 第 28 代接种发病小麦

M λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III; H Healthy wheat; P_1 The first passage of mechanical inoculation; P_2 The second passage of mechanical inoculation; P_{27} The twenty-seventh passage of mechanical inoculation; P_{28} The twenty-eighth passage of mechanical inoculation

图 3 继代接种小麦 WYMV D-RNA2 缺失体的 RT-PCR 检测

Fig 3 RT-PCR analysis of WYMV defective RNA2 generated from the repeated passage inoculation

为了进一步验证 RT-PCR 方法所检测到的 WYMV RNA2 缺失突变体的存在, 本研究采用 WYMV RNA2 特异性的探针 (RNA2 3' 非编码区 cDNA) 对感病小麦中的 WYMV RNA2 组分进行了 Northern blot 检测, 结果发现, 在所有被检测的感病小麦中都有一条全长 RNA2 的主条带, 此外, 在高代次的接种小麦中除了这一主条带, 还有至少 3 条短的条带, 其中最短的一条与缺失了 2 595 nt 的 WYMV RNA2 体外转录物位置一致, 说明这一缺失体是客观存在的 (图 5)。Northern 杂交图还显示, 随着接种代数的提高, 发病小麦体内 WYMV 含量也升高。图中大田和高代 (P₂₈, P₃₀, P₄₀) 的全长及缺失的 WYMV RNA2 量差异明显。

3 讨论

本试验通过连续机械接种,在感病小麦品种鄂恩1号上继代传播、繁殖 WYMV 至 41 代。伴随着继代次数的增加,病毒表现为致病性增强,并在第 27 代、第 28 代及此后抽检的第 32 代和第 33 代中发现感病小麦体内存在一种内部缺失的 WYMV RNA2 分子,而在低代次样品 (P_{26} 或 P_1) 和大田发病小麦 (P_0) 中都没有检测到相应的缺失型 RNA2。

关于对缺失型 RNA2 检测的 Northern 杂交图中呈现的多条分子量较低的次要条带,其原因可能是由于包括基因缺失在内的分子变异现象本来就普遍发生于病毒的复制过程,产生了多样性子代分子群体,这也是病毒对环境变化高度适应性的一种体现^[10]。在本研究中,WYMV 对小麦的侵染途径由真菌根部传播改变为人工叶片机械接种,可能对其中的某种(类)变异分子具有定向选择作用,使其在各种复制的子代分子中的比例得到一定程度的提高。试验中克隆得到的可能是一种比较典型的缺失分子。

Northern 杂交图还显示,随着接种代数的提高,发病小麦体内 WYMV 含量也升高。图 2 中大田和高代 (P_{28} , P_{30} , P_{40}) 的 WYMV RNA2 全长的量差异明显。这与 WYMV 在继代接种过程中的表现一致,随着接种代数的提高,接种小麦的发病时间缩短,发病率提高。那么引起这种现象的原因是什么?针对某种给定的病毒,自然条件下它在特定寄主中的含量维持在一定水平,这是病毒的侵染能力和寄主的基因沉默能力之间平衡的结果。这种平衡发生改变,有可能是病毒的侵染能力提高了,或者寄主的基因沉默能力受到了抑制。本试验虽然不能排除继代接种过程中病毒侵染能力的提高(没测定高代次接种材料和大田发病小麦 WYMV 基因组的差异),但是推测 D-RNA 的出现,可能作为寄主基因沉默的竞争性底物,干扰了寄主对正常 WYMV 的沉默抑制,使 WYMV 的含量得到提高。

真菌传播的病毒产生缺失突变体是一种普遍现象,对于这一现象产生的机制,目前主要有 3 种模型:复制酶介导的模板转换模型 (Replicase-driven template switching model); RNA 断裂-连接模型 (RNA breakage and ligation model); RNA 断裂诱导的模板转换模型 (Breakage-induced template switching model)^[11~13],但是这 3 种模型不能解释所有的缺失现

象。

本实验室的杨军博士曾利用 WYMV 河南潢川分离物进行继代接种,通过 RT-PCR 和序列分析,在经 12 代以上接种的 WYMV 材料中发现了缺失 2 380 bp 的 D-RNA1,缺失区两端存在由 6 个碱基构成的正向重复的序列,可能与造成许多动物和植物病毒重组或缺失的“复制酶介导的模板转换模型”相关。即病毒 RNA 在复制过程中,复制酶-初生链复合体可能从模板的一点转移到相同或另一个 RNA 分子模板下游的相似序列处继续复制,从而产生病毒缺失型 RNA (Defective RNAs, D-RNAs) 或缺失干扰型 RNA (Defective interfering RNAs, DI-RNAs)^[9]。

在本研究中,虽然 WYMV RNA2 大片段缺失 (> 2.0 kb) 的确切机制还不清楚,但是在对 WYMV 缺失型 RNA2 进行的序列分析中发现,所有 9 个克隆的缺失区域边界相同,即 RNA2 上发生的缺失是固定在一个特定区域内,且缺失区两端序列可以通过反向互补构成一个 7 个碱基配对的双链区(即: -TGGATGCTGAT...CCATTCA-),并由此使得缺失区域位于茎环结构的环状部位(图 6)。这与 SBWMV 采取的复制酶跳跃产生缺失突变体的机制很吻合^[7,14]。Nagy 等人也认为,模板间的序列互补能促进重组的发生^[15,16]。分析还发现缺失序列上游紧邻这 7 个碱基双链区存在一富含 AU 的短序列 UU-CUAACACUUAUUACA,富含 AU 的短序列是雀麦花叶病毒 (Brome mosaic virus, BMV)、逆转录病毒和番茄丛矮病毒属的病毒重组的信号和重组热点,可被 RdRp 酶识别,并随后引发重组的发生^[17,18]。在小 RNA 病毒科,富含 AU 的短序列可促进 RdRp 的滑动 (Slippage),提高分子内重组的发生几率^[11,15]。

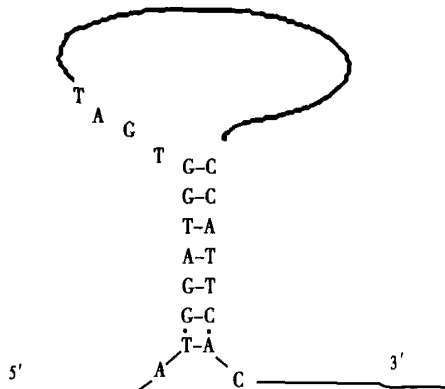


图 6 WYMV D-RNA2 缺失边界区域的模拟结构

Fig 6 Modelling structure of the flanking region in WYMV D-RNA2

通过对 WYMV D-RNA2 的序列分析发现, D-

RNA2 是由 WYMV RNA2 的 5' 和 3' 非编码区以及 P1 基因的 5' 端和 P2 基因的 3' 端组成(图 7), 这与番茄丛矮病毒(Tomato bushy stunt virus, TBSV)通过连续继代接种产生的缺失干扰 RNA 的基因组结构相似: 由两端的非编码区和来源于中部 ORF 的不连续片段组成, 而且这些不连续片段都失去了编码功能^[20]。

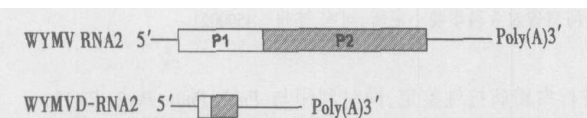


图 7 WYMV RNA2 和 D-RNA2 基因组结构示意图

Fig 7 Genome structure of WYMV RNA2 and D-RNA2

综上所述, 推测本试验检测到的 WYMV RNA2 缺失突变体是复制酶识别了富含 AU 的重组信号, 采用与 SBWMV 同样的机制, 通过复制酶跳跃产生了分子内重组的 D-RNA 分子。这一推测还需要更多的试验加以证实。

参考文献:

- [1] 王鸣歧, 刘国土, 陆秀梅. 小麦梭斑花叶病毒在我国发生的初步研究[J]. 四川农业科技, 1980 (1): 34—35.
- [2] 陶家凤, 秦家忠, 肖际亨, 等. 四川土传小麦黄花叶病的研究[J]. 植物病理学报, 1980 10(1): 5—25.
- [3] 于善谦, 陈仲宜, 徐来升, 等. 发生在我国的小麦黄花叶病[J]. 植物保护学报, 1986 13(4): 217—219.
- [4] Abe H, Tamada T. Parasite of polomyxa betae[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1986 52: 35—247.
- [5] 于嘉林, 晏立英, 苏宁, 等. 小麦黄花叶病毒(WYMV)基因组核苷酸序列分析[J]. 中国科学(C 辑), 1999 29(6): 639—644.
- [6] Tamada T, Schmitt C, Saito M, *et al.* High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by polomyxa betae[J]. Journal of General Virology, 1996, 77, 1359—1367.
- [7] 陈剑平. 中国禾谷多黏菌传麦类病毒研究现状与展望[J]. 自然科学进展, 2005 15(5): 524—531.
- [8] Schenk P, Sohn A, Adams M J, *et al.* Movement of Bymoviruses and functions of RNA2-encoded proteins of Barley

yellow mosaic virus[J]. Agronomie, 1995, 15: 387—391.

- [9] 杨军, 张卫华, 尚巧霞, 等. 小麦黄色花叶病毒低分子量 RNA1 的鉴定[J]. 中国病毒学, 2005, 20(2): 179—183.
- [10] Domingo E, Holland J J. RNA virus mutation and fitness for survival[J]. Annu Rev Microbiol, 1997, 51: 151—178.
- [11] Nagy P D, Simon A E. New insights into the mechanisms of RNA recombination[J]. Virology, 1997, 235: 1—9.
- [12] Pogany J, Romero J, Huang Q, *et al.* De novo generation of defective interfering-like RNAs in broad bean mottle bromovirus[J]. Virology, 1995, 212: 574—586.
- [13] Damayanti T A, Nageno H, Mise K, *et al.* Brome mosaic virus defective RNAs generated during infection of barley plants[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2511—2518.
- [14] Chen J P. Effect of cultivation temperature on the spontaneous development of deletion in soil-borne wheat mosaic fuovirus RNA2[J]. Molecular Plant Pathology, 1995, 85 (3): 299—306.
- [15] Nagy P D, Bujarski J J. Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 6390—6394.
- [16] White K A, Morris T J. Nonhomologous RNA recombination in tobamoviruses: generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletion[J]. J Virol, 1994, 68: 14—24.
- [17] Wu W, Blumberg B M, Fay P J, *et al.* Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus RT *in vitro* is promoted by pausing and results in misincorporation[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 325—332.
- [18] Nagy P D, Bujarski J J. Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus[J]. J Virol, 1997, 71: 3799—3810.
- [19] Pilipenko E V, Gmyl A P, Agol V I. A model for rearrangements in RNA genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 1870—1875.
- [20] Knorr D A, Mullin R H, Hearne P Q, *et al.* De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage[J]. Virology Mar, 1991, 181 (1): 193—202.