维普资讯 http://www.cqvip.com

9-2590

大麦条纹花叶病毒研究进展

彭学贤 曲士绵

（中国科学院微生物研究所 北京）

关键词：大麦条纹花叶病毒 基因组结构 潜在载体

Advance in Research of Barley Stripe Mosaic Virus

Peng Xue-Xian Qu Shi-mian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica Beijing)

Key Words: Barley Stripe Mosaic Virus Genome structure Potential Vector

一、大麦条纹花叶病毒（Barley Stripe Mosaic Virus简称BSMV）

根据国际病毒分类命名委员会第四次报告归属于大麦病毒组[1]。这种病毒在世界范围内都有广泛的分布，由于种子能传毒，随着世界性种质资源的流通，BSMV传遍各大洲，一度严重影响世界大麦的产量。在Montana由于此病害从1953—1970年造成三千万美元的损失；1955年仅在Montana和North Dakota就使大麦减产25—30%。在我国新疆各地良种繁殖场上看小麦普遍发现有BSMV侵染，用酶联免疫血清分析法检测新疆、河北、江苏等地的麦种，表明BSMV广泛分布在全国各地。由于这种病毒在农业生产上有重要的经济意义，所以在对病毒的诊断、病毒与寄主间的相互关系，病毒的流行与控制等方面引起人们的关注。过去25年中在病毒生物学性质方面已积累了大量的资料。进入80年代随着病毒分子生物学的进展，对BSMV基因组成分、末端结构、功能表达、序列分析及基因图谱方面都做了不少工作。本文主要着眼在归纳综述上述诸方面的有关资料，并在讨论其传播方式的基础上分析其可能的应用前景。

二、病毒的形态结构

BSMV为短棒状病毒，其大小在不同报告中有微小差异，平均125—130nm，直径约为22nm。

病毒由正单链RNA及外壳蛋白亚基组成，其外形结构很像TMV，平均每个有病毒粒子由1150个包被在外的蛋白亚基组成，RNA螺旋缠在内，并形成4nm内径的中空轴。病毒的等电点约为pH4.5。当悬浮在10mM pH7.0的磷酸缓冲液中时其紫外吸收特征为A_{max}=270nm，A_{min}=250nm，A260/280=1.0—1.05，0.1%的病毒悬浮液在光路为1cm时A_{260}=2.6。

病毒分子量为2.6×10^7其中99%为外壳蛋白，3.7—4.0%为RNA，蛋白亚基分子量25000道尔顿，为一糖基化蛋白，核酸分子量范围1×10^6—1.5×10^6。

本文于1988年2月12日收到。
本文承蒙莽克强教授审阅并提出宝贵意见，特此致谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

三、病毒基因组结构

1. BSMV 是三组分 RNA 病毒 早期人们通过病毒RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析，证明 BSMV RNA 的组分数随株系而异，可分二、三、四组分的不同株系，二组分 BSMV 以典型株、苏联株为代表，三组分株系如 North Dakota 18（ND18），Norwich(NW)株系，四组分的如阿根廷温和(Am)株系。用甲酰胺变性RNA，或不变性直接电泳测定 RNA1—4 的分子量分别是 1.43、1.25、1.11 和 0.99×10^6。

Gustafson 等(1982)[6] 应用重组 DNA 技术否定了上述关于基因数目的结果。他用 DNA18 RNA 的重组 DNA 克隆经缺刻翻译制成 ^{32}P 标记探针对不同株系的BSMV做RNA 转印分子杂交分析(Northern blot)，证明所有已知的 BSMV 都是三组分 RNA 病毒，原来的两组分也是三组分，因为三组分 ND18 的 RNA_2 及 RNA_3 的 cDNA 克隆都能与“两组分”株系的 RNA_2 杂交，而这两个 cDNA 长度的总和超过“两组分”株系 RNA_2 长度的15%，两个 cDNA 又没有序列同源性，因此可以判断“两组分”株系的 RNA_2 包含有两种不同的 RNA 分子，一种与 ND18（或NW）的 RNA_2 有同源序列，而另一种与ND18（或NW）的 RNA_3 有同源序列，由于两种 RNA 的分子量相同，所以在电泳时呈现一条带。因此“两组分”株系实际上是伪两组分（psudo-two components）。至于四组分的 Am 株系，在杂交实验中也证明是三组分株系，而且是包含有伪两组分的混合株系，因为 Am RNA_2 可以和 ND18 RNA_2 及 RNA_3 的 cDNA 杂交，像在伪两组分中的情况一样，而 Am RNA_3 和 RNA_4 都能专一性地和 ND18 RNA_3 的 cDNA 杂交，说明 Am RNA_3 及 RNA_4 是同源的，都属于 BSMV RNA 的第三组分。

在我国新疆小麦上分离到的大麦条纹花叶病毒经甲酰胺或乙醛变性 RNA后，凝胶电泳鉴定或将电泳分离的 RNA 转印到硝酸纤维素膜上，用总 RNA 的 cDNA 做探针，分子杂交的结果也证明 BSMV 新疆株系是三组分 RNA 病毒[7][8]。

如果用核苷酸数目表示 BSMV-RNA 结构，关于 BSMV 核酸组分的研究可以归纳为三组分 RNA 病毒的 BSMV 其 RNA_1 及 RNA_2 分别为 4200 和3650 个核苷酸，而 RNA_3在不同株系中不同，它们可以是 3650 个核苷酸，跟 RNA_2 大小相同(如在典型株中，所以电泳时不能与 RNA_2 分开，）它也可以是 3250 个核苷酸，（如在 NW 或ND18株系中，在电泳时病毒核酸显示三条带，）也可以是 2900 个核苷酸。Am 株系的 RNA_3 是3650，3250及2900个核苷酸的混合物。

由于 RNA_3 在BSMV 中的复杂状态，给早期研究 BSMV RNAs 之间序列同源性问题带来麻烦，Palomar et al（1977）[5] Taliansky（1979）[6]的工作都指出 RNA_1及 RNA_2 有不同的序列，但 RNA_3 与 RNA_2 之间却有广泛的序列同源性。Gustafson 1983 年利用基因工程技术获得了包括 BSNV ND18 株 RNA_{1-3} cDNA 的三种重组质粒，它们分别复盖 RNA1—3 的44%，63%及70%，但都不包括每种 RNA 的 3′端及 5′端，用它们做探针与不同株系的 BSMV RNA 杂交，不仅证明不同株系同种 RNA 之间广泛同源，同时也清楚的显示了不同 cDNA 杂交上的专一性，说明不仅 RNA_1 及 RNA_2 之间有不同的序列，而且 RNA_3 70%的序列也与 RNA_2 不同。我们在 BSMV 新疆株上的类似工作也得到相同的结果。因此要澄清这一争议，只有先对早期作者所用的 BSMV 株系中 RNA_3 的存

维普资讯 http://www.cqvip.com

在状态加以分析和鉴定才有可能。

对侵染性而言三种RNA都是必不可少的。丢失其中任何一种都会导致侵染性的丧失。以前关于某些株系的组分数在传代过程中会发生丢失的报告我们认为也可能与BSMV RNA_3的存在状况有关。如Am株系有实验证明在传代过程中RNA_3及RNA_4可能丢失，但这并不意味着BSMV的侵染性可以不需要RNA_3，因为Am株含有假两株系。随着研究的深入以及基因工程技术的应用，该问题必将得到进一步澄清。然而感病植物中三种RNA的比例却会因光照、温度等不同培养条件发生显著变化，这可能跟各种RNA功能上的不同有关。因为在不同温度光照下，有报道说病毒的含量没有变化，伴随着各RNA组分比例的不同，感病植物的症状轻重也明显不同。

2.RNA的5′帽子结构及3′端tRNA结构 Agranovsky等1979[10]用间高碘酸钠氧化和硼氢化钠还原标记m^7G，在高压液相层析上分析证明70%的NW株系总BSMV RNA含有5′末端7-甲基帽式结构，至少NW株中基因组RNA_1及RNA_3是有帽子的，但还不清楚为什么在RNA_2中未能检查到此结构。

用Poly(u) Sepharose或寡dT cellulose柱亲和层析可将BSMV RNA分成能吸附结合的$polyA^+$部分及不能吸附结合的$polyA^-$部分[11]大约80% BSMV RNA含有足以被亲和吸附的polyA结构。对单一的RNA组分做亲和层析发现90% RNA_1是$polyA^+$分子，而70%的RNA_2分布在$PolyA^-$中，无论是$PolyA^+$或$PolyA^-$的BSMV RNA都有侵染性。用酶降解得到的抗RNase的PolyA片段大约有8—30个核苷酸片段。

像植物病毒组中的tymo-，tobamo-，bromo-和Cucumo Viruses一样，BSMV RNA基因组3′端亦有可以接受氨基酸的tRNA结构，在有氨基酰tRNA合成酶和^3H-酪氨酸的体外体系中BSMV不同株系或同一株系的不同RNA都可以使酪氨酸、氨酰化[12]。

BSMV RNA与寡$(dT)_{10}$混合、退火，再用RNaseH水解，可将全长的BSMV RNA分割成大小不同的两段，具有3′端tRNA结构的小片段，平均长度约为210个核苷酸，说明PolyA插在BSMV RNA 3′ tRNA结构末端及5′基因编码区之间。失去Poly(A)及3′端tRNA结构的大片段没有侵染活性，但在体外蛋白合成系统中具有翻译活性。

在植物病毒中，多数基因组RNA的3′端是tRNA结构，少部分为PolyA结构如Como Virus、nepovirus、Poty Virus、Potex Virus，但同时具有PolyA及tRNA结构的目前只有两种：BSMV及BMV的RNA_2。BMV、RNA_2的PolyA正好将该RNA上的两个顺反子隔开，而在BSMV中PolyA在三种RNA基因编码区以外。BSMA RNA 3′端的这种特殊结构可能在病毒繁殖核酸复制等方面起着重要作用。

3.BSMV的亚基因组结构 一些植物病毒中存在有亚基因组结构，它们可以自主转录病毒基因组中关闭的密码子的信息，如TMV中外壳蛋白密码子在TMV基因组中是关闭的，转录由亚基因组完成。不同于TMV的是BSMV亚基因组是包有病毒蛋白外壳并与基因组共包壳的。迄今为止所有已报道的国外株系中都发现有微量存在的亚基因组颗粒。结构分析表明它们由800个核苷酸组成，在其3′端从10到150长短不等的PolyA，不同株系的亚基因组3′端至少有160个碱基序列完全一致。用亚基因组RNA的cDNA为探针与病毒基因组RNA杂交，证明只有RNA_3与亚基因组有同源性。序列分析表明亚基因组RNA 3′端与基因组RNA_3 PolyA上游至少95个核苷酸序列完全相同，明证亚基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

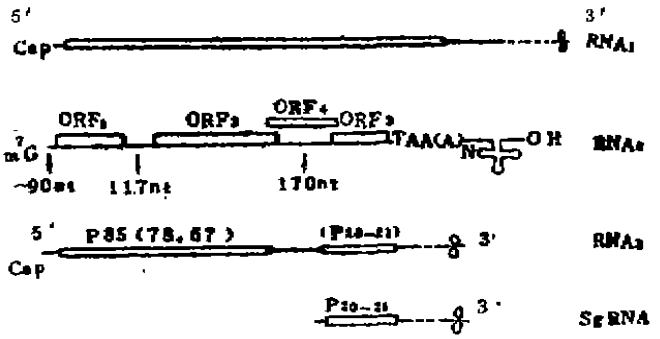
组编码的序列定位在 RNA 3′端 PolyA 结构的上游部位[13][14]。

在蛋白质体外翻译体系中，亚基因组 RNA 能编码翻译产生 20—21×10^3 的两个多肽，它们有别于 RNA_2 上外壳蛋白基因所编码的分子量为 25000 的病毒外壳蛋白。在感病大麦植株蛋白的凝胶电泳图谱中不能检查到这两种多肽，其生物学功能尚不清楚。总之 BSMV 的亚基因组不同于大多数植物病毒的亚基因组，它不具有来源于编码外壳蛋白的基因组并具编码外壳蛋白的特征。

4. 基因组功能、序列及基因图谱 BSMV RNA 体外无细胞翻译体系的研究表明 RNA_1 编码120k多肽占全部 RNA_1 编码信息的80%，RNA_2 编码 25k 多肽，RNA_3 的翻译产物依株系而异，有 85k、78k、75k 等[7][15]。根据免疫沉淀放射自显影，氨基酸组分特异性分析等手段证明 25k 为 BSMV 外壳蛋白，说明外壳蛋白基因定位在 RNA_2 上。分离感病大麦的聚核糖体其主要体外翻译产物为 120k、67k 及 25k 多肽，与 BSMV RNA 在植物体内的翻译产物相似，推测85K，78K，能经过体内加工变成67K[16]。对 120k 及 67k 多肽的生物学功能还全然无知。

Gustafson[17]对 RNA_2 进行了全序列分析，弄清了 RNA_2 上的基因排列情况，证明除外壳蛋白基因以外，还有另外三个阅读框架，彼此不连续。

综合基因组结构，功能的研究可将 BSMV基因线性图谱初步描绘为：



3′端虚线表示 Poly A结构，-8-表示tRNAS结构

各阅读框架编码蛋白的分子量分别为：

ORF_1	22,147（外壳蛋白）
ORF_2	58,098
ORF_3	17,375
ORF_4	14,419

序列分析进一步证实外壳蛋白基因定位在RNA_2 5′端第一个阅读框架上，它可以直接高效表达，而不同于 BMV、CMV等三组分基因组病毒外壳蛋白须经过亚基因组表达。另外三个阅读框架编码的蛋白在体内并没有发现相应大小的产物，但就其编码能力而言 BSMV RNA 大于其它多组分 RNA 病毒，如 BMV、CMV、AMV 编码四种蛋白，而 BSMV 可以编码的不是四种蛋白而是 6—7种蛋白。

Edwards 和 Timians（1986）[18]将四种 BSMV 分离物的 RNA 组分进行混合重组，所谓的拟重组病毒 RNA 做侵染实验，检查各 RNA组分在致病性、毒力、症状等方面的作用，初步遗传学分析表明 RNA_1 控制 BSMV 在寄主上的致病性，而症状的表现是一个

维普资讯 http://www.cqvip.com

复杂的病毒与寄主相互作用的结果，RNA_2 和 RNA_3 的变化足以影响毒力和症状。而且同源 RNA 重组比异源 RNA 重组更能影响症状表现。

四、病因学与传毒方式

BSMV 在麦子上的症状表现为深绿和浅绿相间的不规则条纹，而早期症状是表现在新叶的基部出现黄色或白色的退绿条纹，进而扩展到全植株发生系统花叶，并出现植株矮化，花药、雌蕊发育不全，种子皱缩等。

BSMV 除感染大麦小麦外，随株系的不同还可以侵染多种禾谷类单子叶植物如玉米、水稻高粱，个别株系还能侵染少数双子叶植物，在双子叶植物上的症状表现多为退绿斑或坏死枯斑[19]。

关于病毒在体内复制的机制研究虽然早在70年代初就发现感病植株体内含有病毒特异的双链 RNA，RF 型及 RI 型以及单链 RNA 伴随症状表现的消张情况，但对于病毒 RNA 现体内复制的动力学过程、复制的调控等都还没有系统的有说服力的报道，Na-Shang Lin[20] 等最近对病毒在细胞内的繁殖进行了细胞学观察，提出侵染过程细胞学变化的四个阶段及前质体（proplastide）在病毒复制及装配中的作用，当含有纤维状物质的前质体周围囊泡出现时是侵染的早期信号，细胞化学及免疫电镜证明纤维状物质是或者包含 dsRNA，作者相信该 dsRNA 是病毒特异的。

BSMV 的流行及自然传播方式主要靠带毒的种子及花粉传播，人为的机械摩擦也可以使 BSMV 侵染，至今未发现土壤和媒介昆虫可以传毒。种子带毒的比例取决于寄主种类，病毒株系，环境条件以及植物感病时间等。以我国新疆欧柔春麦为例，1977年病株种子带毒率最高为90%，最低为38.9%，平均为72%。病毒在小麦中可以存活20年，在大麦中也可以存活数年。

对于BSMV 种传机制细胞学的研究表明病毒最早可以侵染花的初级分生组织，然后使大孢子母细胞感病，进而发育成带毒的胚珠。对花粉传毒的电子显微镜观察看到大麦花粉粒中有晶体排列的 BSMV，意味着病毒能在单倍体细胞中复制。细胞学研究指出在花粉的精核及营养核中都有病毒颗粒，在花粉传毒是 BSMV 从精子细胞直接进入卵细胞，而不是通过花粉营养细胞或花粉壁进入雌蕊。

BSMV 在玉米上可引起不符合孟德尔基因分离律的畸变，标准差可大于 2，子代异源显性及同源显性基因型的正反交其分离率可以从正常的1：1偏差至60：40至100：0。同时 BSMV 感染大麦可以增加大麦出现三倍体及非整倍体的频率。引起玉米畸变 aberration ratio)的机制尚不清楚。人们曾假设 BSMV RNA或其一部分核苷酸序列与玉米基因组 DNA 整合，引起玉米基因组变化或者干扰某种基因的调节。新近用含有 BSMV 部分 RNA 的 cDNA 克隆做探针与 BSMV 引起玉米突变株 DNA 杂变，发现在突变株 DNA 上出现的 3.3kb 的插入子中不含有 BSMV 同源序列[21]。本实验室用 BSMV-XJ 株进行 southern 杂交并未发现感病大麦细胞中存在有 BSMV RNA 的 cDNA。虽然以上实验还有待于在严格的条件下重复，但人们仍然推测：①BSMV RNA 可能有转座子功能，在种胚及花粉中整合到寄主 DNA 上，但不能通过有丝分裂在胚期以后随寄主复制。②BSMV 侵染可以调动玉米内源休眠的转座子，使玉米产生突变株。

维普资讯 http://www.cqvip.com

五、大麦条纹花叶病毒做为潜在的植物基因工程载体研究的可能性。

植物基因工程在微生物和动物基因工程迅速发展的影响下，日趋受到重视，将目的基因导入植物体内的手段除 Ti 质粒外，目前又广泛发展了电激（electro-poration）法。Ti 质粒经过充分的基础研究现已被改造达到可应用的程度，然而目前 Ti 质粒仍受其寄主范围较狭的限制，主要用于双子叶作物电激目的基因之后也还要承受巨大的筛选工作。因此寻找更多的载体如具有寄主范围广，易于在寄主内迅速繁殖，扩散等特点的载体，将有利于进一步推动植物基因工程的发展。植物 DNA 病毒如花椰菜花叶病毒（ca-MV）能满足上述要求，但做为载体仍有寄主范围狭，可容纳的外源基因太小，不能与寄主染色体整合而不能将外源基因传代的缺点。植物 RNA 病毒具有寄主范围广，一旦侵染后可以散布周身，并能大量复制，从而获得大量拷贝数外源基因的特点，而把大麦条纹花叶病毒做为潜在的植物基因工程载体的研究对象更有其有利条件：①寄主范围包括重要的单子叶经济作物如大、小麦、玉米、水稻等，可以弥补 Ti 质粒的不足。②可以种子传，因此外源基因一旦随病毒侵入植物有可能传入后代。③做为多组分棒状病毒包括三种 RNA，便于改造，易容纳较大的外源基因。③体内复制效率高，病毒产量约为 500mg/公斤病叶。但是存在的问题是人们对 BSMV 基因组结构的研究还仅仅开始，要在DNA水平上研究 BSMV 基因组的结构和功能还有大量的基础工作要做，要获得三种 RNA 的全长 cDNA 克隆；剪切、插入后的 cDNA 要在建立的体外转录体系中转录我们侵染活性的 RNA；检测改造后的病毒功能性状的变化；选择最适外源基因插入位点等等。除此外还要深入研究 BSMV种传的分子机制，提高种传比例，解决插入的目的基因世代相传问题。

1986年美国及日本在利用植物 RNA 病毒做为载体的研究中取得一些突破性进展，除了在 cDNA 水平上将病毒 RNA 改造成为基因工程载体，体外转录成有侵染性 RNA 外，还使插入的外源目的基因在细胞内高效表达，其表达水平比 Ti 质粒做载体还要高数倍[22]，从而打开了植物 RNA 病毒做为载体的新局面，使该项研究的可行性大大向前跨进。

参 考 文 献

〔1〕 Matthews, R.E.F.1982.*Intervirology* 17: 1
〔2〕 Jackson, A.O.et al.1973.*Virology* 55: 483—495
〔3〕 Lane, L.C.1974.*Virology* 58, 323.
〔4〕 Dolja, V.V.1979.*Mol.Gen.Genet.*175: 93—97.
〔5〕 Palomar, M.K.et al.1977.*Virology* 77: 471—480.
〔6〕 Gustafson, G.D.et ar.1982.*Virology* 120: 182—193.
〔7〕 彭学贤，1985 病毒学报 1: 157
〔8〕 彭学贤，1986 病毒学报 2: 238
〔9〕 Taliansky, M.E.et al.1979.*Mol.Gen.Genet.*175: 89
〔10〕 Agranovsky, A.A.et al.1979.*Virology* 95: 208—210.
〔11〕 Agranovsky, A.A.et al.1978.*Virology* 91: 95—105.
〔12〕 Agranovsky, A.A.et al.1982.*Virology* 119: 51—58

维普资讯 http://www.cqvip.com

〔13〕 Stanley, J.et al.1984.*Virology* 139: 375—383.
〔14〕 Jackson, A.O.et al.1983.*Virology* 127: 37—44.
〔15〕 Dolja, V.V.et al.1983.*Virology* 127: 1—14.
〔16〕 Gustafson, G.D.et al.1981.*Virology* 111: 579—587.
〔17〕 Gustefson, G.D.et al.1986.*Nucleic Acids Research* 14: 3895—3909.
〔18〕 Edwards, M.C.et al.1986.*Phytopathology* 76: 360—365.
〔19〕 Jackson, A.O.et al.1981.*Hordie iruses. In Handbook of Plant Virus Infections* P 565—625.Elsevier/North-Holld, Amsterdam/New york.
〔20〕 Na-shang Lin, et al.1985.*Virology* 142: 291—298.
〔21〕 Mottinger, J.P.et al.1984.*Mol.Gen.Genet*: 291—369.
〔22〕 Ahlquist, P.et al.1986.*Science* 231: 1294—1297.