

170-175

第11卷第2期  
1996年6月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol.11 No.2  
Jun. 1996

15974(13)

应用单链构象多态性-聚合酶链反应研究  
我国大麦黄花叶病毒株系的分化

施农农

陈剑平\*\*

(杭州教育学院, 杭州 310004) (浙江省农业科学院, 杭州 310021)

S432.41

**A** **提要** 根据致病性差异,我国大麦黄花叶病毒(BaYMV)存在若干不同株系,血清学和核酸杂交等技术不能区分这些株系。但还由于致病性不同,各株系的核酸序列间必定存在差异。最近建立的单链构象多态性-聚合酶链反应(SSCP-PCR)技术能灵敏而有效地诊断和区分核酸序列间的差异,从而进一步证实我国 BaYMV 不同株系的分化。

**关键词** 大麦黄花叶病毒, 株系, 反转录-聚合酶链反应, 单链构象多态性

大麦黄花叶病毒(Barley Yellow Mosaic Virus, BaYMV)是亚洲和欧洲冬大麦的一种重要病毒病。在我国存在几个株系<sup>[1]</sup>。自七十年代中期在浙江省发生以来,现已普遍发生于上海、江苏、安徽和湖北等长江中下游及东部沿海地区,并造成严重危害<sup>[2]</sup>。BaYMV 只感染大麦及其密切相关的一些种<sup>[3]</sup>。

BaYMV 由土壤中的禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播<sup>[4]</sup>。此真菌介体体内带病毒,其游动孢子侵染大麦根部,把病毒传播给大麦,其休眠孢子具有厚壁,在土壤中存活 10 年后仍能传播病毒<sup>[4]</sup>。目前防治此病害的主要方法是使用抗病品种。

但是由于病毒存在着复杂的株系分化,单一或抗性基因型相同的抗病大麦品种不能兼抗不同的病毒株系。日本根据 BaYMV 对不同大麦品种的致病性反应,划分出 6 个不同的株系<sup>[5]</sup>。欧洲在推广抗病品种时,发现这些品种在局部地区感病,从而报道了 2 个株系(即原来的普通株和后来的“抗性克服株”)最近,我们应用一些从日本和欧洲引进的大麦品种,在我国阜宁、盐城、南通、如东、扬州、海安、上海和嘉善等 BaYMV 病区进行试验,发现各病区的致病性存在差异,且与已报道的日本和欧洲株系不同<sup>[1]</sup>。

本文通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphisms)对我国 BaYMV 分离物进一步进行比较。

## 材料和方法

## 1 病毒分离物

1994 年 3 月中旬和 1995 年 3 月上旬,分别从江苏省阜宁县施庄和盐城市郊区、扬州市下河地区农科所农场、如东县农科所农场、海安县农科所农场、南通市农科所农场、浙江省嘉善县良种场、浙江省农科院农场、

本文于 1995 年 8 月 24 日收到,11 月 24 日修回

\* 本工作得到欧共体和浙江省自然科学基金会资助。

\*\* 通讯作者。

宁波市妙山农场等地 BaYMV 病田和江苏沿海地区农科所上海病圃(图 1)采集具有典型 BaYMV 症状的大麦叶片, -70℃ 贮藏或冷冻干燥后备用。

Distribution of Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) in China

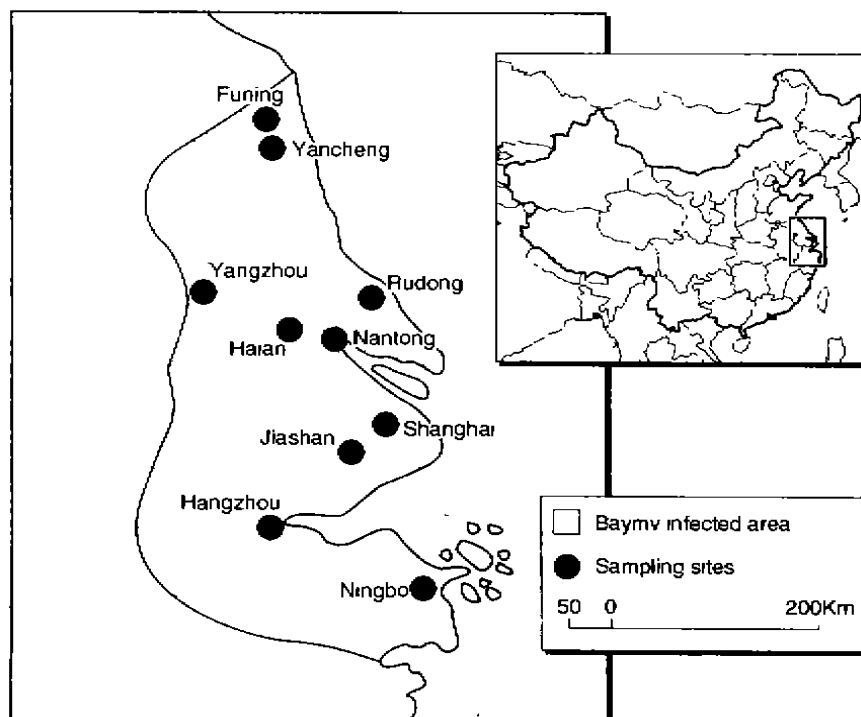


图 1 中国大麦黄花叶病分布及其取样点

Fig 1 Distribution and sampling sites of barley yellow mosaic virus(BaYMV) in China

## 2 植物总 RNA 抽提

抽提方法参见文献<sup>[6]</sup>。

## 3 RT-PCR

3.1 第一链 cDNA 合成:5 μl 病大麦叶总 RNA(约 33 mg)作为模板用于第一链 cDNA 的合成。引物为 5'-GTCACATTCCTGTGTA-3'。此引物的序列与日本 BaYMV RNA2 3'端 17 个碱基(3585-3569)互补<sup>[6]</sup>。方法参见文献<sup>[7]</sup>。

3.2 PCR 扩增:4 对引物用于 BaYMV RNA2 局部区域 DNA 片段的扩增(图 2)。各引物按照日本 BaYMV RNA2 序列<sup>[6]</sup>设计。引物 NS1(5'-CAAAACGAAACAAACACA-3')与第 31~48 个碱基之间的序列一致,引物 NS5(5'-AAACCGCCAAGATTGAT-3')与第 1282~1266 碱基之间的序列互补,此对引物扩增一个约为 1.25 kbp 的 DNA 片段;引物 NS9(5'-CACAAATTGGAACCTCTG-3')与第 943~959 个碱基之间的序列一致,NS10(5'-TGGAATTCACACGCTT-3')与第 1647~1630 个碱基之间的序列互补,此对引物扩增一个约为 0.70 kbp 的 DNA 片段;引物 NS19(5'-CCGTCATCCTACTGTTTGC-3')与第 92~110 个碱基之间的序列一致,NS20(5'-CTGACTGTTATGAATCGAT-3')与第 997~979 个碱基之间的序列互补,此对引物扩增一个约 0.90 kbp 的 DNA 片段;NS3(5'-GAACCAGTTGCTAGTGG-3')与第 1521~1537 个碱基之间的序列一致,NS6(5'-AGACAACCTCCCAAAA-3')与第 1854~1838 个碱基之间的序列互补,此对引物扩增一个约 0.33 kbp 的 DNA 片段。

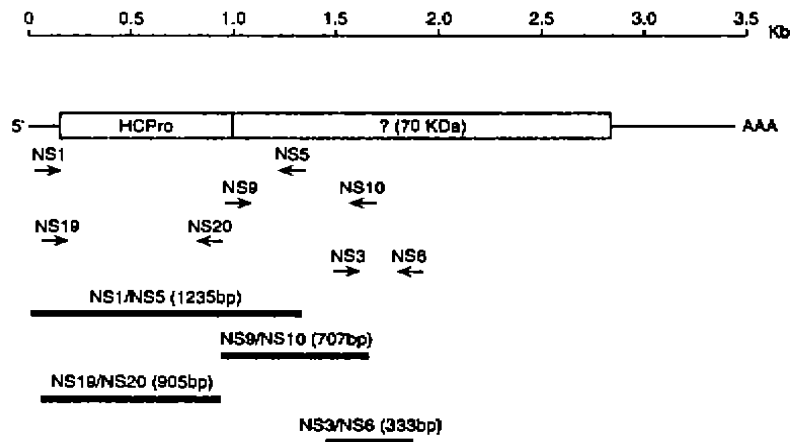


图 2 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增区域示意图

Fig 2 Locations of RT-PCR fragments amplified from cDNA templates of BaYMV RNA2

在 50  $\mu$ l 的 PCR 反应中, 含有 1  $\mu$ l cDNA; 一对引物, 浓度均为 20 pmol/L; 4 种 dNTP, 浓度各为 200  $\mu$ mol/L; 盐浓度为 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 50 mmol/L KCl 和 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3。反应混合物经 94  $^{\circ}C$  变性 3 分钟后, 加入 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim 公司产品), 然后以 94  $^{\circ}C$  变性 1 min, 45-47  $^{\circ}C$  退火 1 min, 72  $^{\circ}C$  延伸 1-2 min, 进行 30 个循环。反应结束后, 每样品取 5  $\mu$ l 进行琼脂糖电泳检测。

#### 4 SSCP-PCR 方法参见文献<sup>[8]</sup>。

4.1 RT-PCR 产物电泳分离 RT-PCR 产物与等体积电泳指示剂混合, 加热变性后, 上样于 10% 或 12% 聚丙烯酰胺胶, 在 0.5  $\times$  TBE 缓冲液, 250V 下 18 $^{\circ}C$  电泳过夜。

4.2 银染 所有步骤都在摇床中进行。凝胶于 50% 酒精/10% 醋酸液中固定 1 h, 10% 酒精/1% 醋酸液中固定 1 h, 然后于 0.2% 硝酸银溶液中染色 1 h, 蒸馏水清洗 2 次, 每次 2 min, 凝胶于 200 ml 3.4% 氢氧化钾/150  $\mu$ l 40% 甲醛溶液中显色 10-15 min, 25% 酒精/5% 醋酸溶液中终止反应 5 min, 蒸馏水清洗后拍照。

## 结 果

用对 BaYMV RNA2 特异的 4 对引物分别对阜宁、盐城、扬州、如东、海安、南通、上海、嘉善、杭州和宁波等 10 个 BaYMV 分离物的 RNA2 cDNA 进行 RT-PCR 反应, 分别产生预期的 1.25 kbp, 0.90 kbp, 0.70 kbp 和 0.33 kbp 的特异性 DNA 片段。图 3 为各分离物用四对引物扩增的产物合并后进行的电泳。这些 RT-PCR 扩增结果表明, 我国供试的 10 个 BaYMV 分离物的 RNA2 序列同源性较强, 所选择的 4 对引物均能与各分离物 RNA2 结合, 相同的引物扩增相同大小的 DNA 片段, 彼此不能用常规电泳加以区分。然而既然各分离物之间对大麦的致病性存在差异, 从而核酸序列间也必定有着变异。用经引物对 NS19/NS20 扩增的 RT-PCR 产物 0.90 kbp 经 SSCP 分析, 五次重复均获得相同的电泳图谱, 供试的阜宁、盐城和杭州等 3 个分离物泳动图谱相似; 如东和嘉善 2 个分离物相似; 上海和宁波 2 个分离物相似; 其余分离物的泳动图谱均显著不同(图 4), 这些结果表明各分离物之间存在着序列的差异, 从而进一步证实了我国病毒的株系分化。

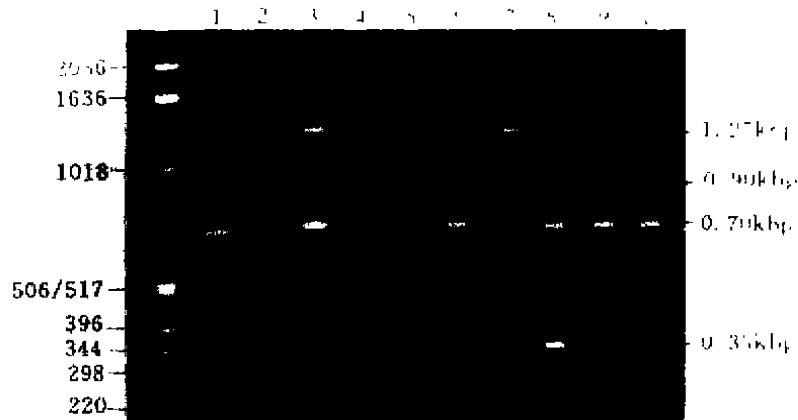


图3 用图2所示的4对引物从大麦黄花叶病毒 RNA2 模板上扩增的 RT-PCR 片段  
样品(1)阜宁,(2)盐城,(3)扬州,(4)如东,(5)海安,(6)南通,(7)上海,(8)嘉善,(9)杭州,(10)宁波

Fig 3 RT-PCR fragments amplified from cDNA templates of BaYMV RNA2 with the four primer pairs of Fig 2  
(1)Funing, (2)Yancheng, (3)Yangzhou, (4)Rudong, (5)Haian, (6)Nantong, (7)Shanghai, (8)Jiaishan, (9)Hangzhou, (10)Ningbo

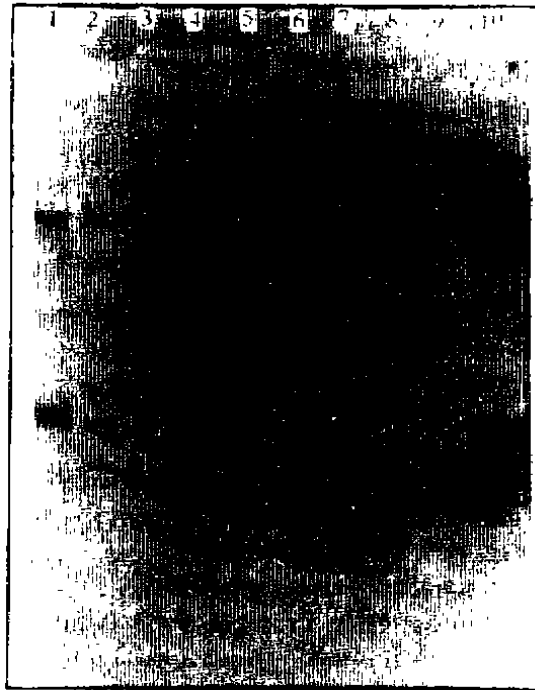


图4 用引物 NS19/NS20 扩增的 RT-PCR 片段(约 0.90 kbp)所作的单链构象多态性分析  
(1)阜宁,(2)盐城,(3)扬州,(4)如东,(5)海安,(6)南通,(7)上海,(8)嘉善,(9)杭州,(10)宁波

Fig 4 Single-strand conformation polymorphisms analysis of RT-PCR fragments (c. 0.90 kbp) amplified from BaYMV RNA2 templates with primer pair NS19/NS20  
(1)Funing, (2)Yancheng, (3)Yangzhou, (4)Rudong, (5)Haian, (6)Nantong, (7)Shanghai, (8)Jiaishan, (9)Hangzhou, (10)Ningbo

## 讨 论

结果表明,我国 BaYMV 根据分离物存在致病性不同,这些差异可以用一套欧洲和日本大麦品种进行区分<sup>[1]</sup>。它们的致病性与已报道的 6 个日本株系和 2 个欧洲株系不同。我们曾用多克隆抗体进行 ELISA 和 Western blot 等血清学分析,试图区分各分离物之间的差异,均未能成功,这与以前用免疫电镜研究所得的结果<sup>[9]</sup>一样。对这些分离物外壳蛋白基因序列进行分析,发现其同源率高达 95~99%,但无一彼此完全相同。由外壳蛋白基因序列推测的外壳蛋白氨基酸序列的同源性也高达 97~100%,其中南通和盐城,海安和阜宁分离物(株系)外壳蛋白完全一致(施农农,未发表)。它们与已报道的日本和欧洲 BaYMV 外壳蛋白基因序列也有差异。最近我们应用单克隆抗体区分了土传小麦花叶病毒美国和法国分离物外壳蛋白之间单个氨基酸的差异<sup>[10]</sup>。能否用单克隆抗体来区分我国 BaYMV 株系,则有待进一步研究。

我国 BaYMV 各分离物均含有分子量一致的 RNA1 和 RNA2 基因组,其同源性很强,Northern blot 分析不能加以区分(结果不作详细叙述)。用 4 对引物所进行 RT-PCR 产物经常规电泳分离也不能进行株系的区分。

唯一能快速诊断和区分这些分离物的方法是 SSCP-PCR。SSCP-PCR 是检测基因组之间微小差异的有效方法<sup>[8]</sup>。当双链 DNA(如 PCR 产物)的正链和负链经 70℃ 处理变性后,达到一种序列特异的亚稳定构象。不同构象在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳中决定了特异的移动性。SSCP-PCR(见图 4)重演性好,只要控制好电泳温度(18℃),就能获得稳定的泳动图谱。Orita 等<sup>[8]</sup>报道应用这个技术可以检测 2 个 DNA 片段中一个碱基的差异,至于供试的 RT-PCR 片段中,各分离物或株系间存在多少个碱基的差异,则有待进一步序列分析测定。显然,SSCP-PCR 对于大或样品基因组变异的比较,病毒株系(尤其是血清学难以区分)的鉴定,是一种理想的检测、诊断技术。

**致谢** 本文承中国科学院微生物研究所刘玉乐副研究员审阅,特此致谢。

## 参 考 文 献

- 1 Chen J, Adams M J, Zhu F, *et al*. Barley yellow mosaic virus strain differences in China revealed by the response of foreign barley cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, (in press)
- 2 阮义理,陈剑平.大麦黄花叶病研究进展. *大麦通讯*, 1987;4:1~4
- 3 阮义理,金登迪.大麦黄花叶病研究. *植物病理学报*, 1983;13(3):49~55
- 4 陈剑平,阮义理.禾谷多粘菌传播植物病毒的证据. *浙江农业学报*, 1991;3(4):202~205
- 5 Kashiwazaki S, Ogawa K, Usugi T, *et al*. Characterization of several strains of barley yellow mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989;55:16~25
- 6 Kashiwazaki S, Minobe Y, Hibino H. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA2. *Journal of General Virology*, 1991;72:995~999
- 7 Chen J, MacFarlane S A, Wilson T M A. Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soilborne wheat mosaic virus RNA2 associated with increased symptom severity. *Virology*, 1994;202:921~929
- 8 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al*. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989;5:874~879

- 9 陈剑平, 阮义理, 徐均焕, 等. 应用免疫电泳技术研究我国三种真菌传播线状麦类病毒的血清学关系. 病毒学报, 1990; 6 (3): 239~244
- 10 Chen J, Torrance L, Cowan G, H, *et al.* Detection of single amino acid difference(s) between the coat protein of soilborne wheat mosaic virus isolates by monoclonal antibodies. *Phytopathology*, (in Press)

## Detection of Barley Yellow Mosaic Virus Strain, Variations in China by Examining Single-Strand Conformation Polymorphisms of RT-PCR Products

Shi Nongnong

(*Hangzhou Educational Institution, Hangzhou 310004*)

Chen Jianping

(*Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021*)

Several strains of barley yellow mosaic virus (BaYMV), each distinct from those recognised in Japan and Europe, have been identified in China based upon the response of foreign barley cultivars. These strains are identical in serological properties and can not be distinguished by ELISA and Western blot; They are also probably high homologous and can not be distinguished by Northern blot analysis and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). However, since their pathogenicities are different, they must have some variations at nucleic acid level. These variations can be detected by examining single-strand conformation polymorphisms of RT-PCR products, which further confirmed that different strains of the virus are presented in China.

**Key words** Barley yellow mosaic virus, Strain, RT-PCR, Single-strand conformation polymorphisms