

我国真菌传线状小麦花叶病毒病原初步 鉴定为小麦黄花叶病毒(WYMV)*

雷娟利 陈炯 陈剑平** 郑滔 程晔

(浙江省农业科学院, 杭州 310021)

S435.121.9
S432.41

摘要 由禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播的线状小麦花叶病毒有两种,一种是加拿大首先报道的小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV),另一种是日本报道的小麦黄花叶病毒(WYMV)。这两种病毒粒子形态以及血清学性质非常相似,但核酸序列存在一定差异。经反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和单链构象多态性分析(SSCP),明确我国广泛发生的禾谷多粘菌传线状小麦花叶病毒都是小麦黄花叶病毒,但供试的8个分离物 RNA1 和 RNA2 序列存在差异,无一彼此完全相同。

关键词 真菌传线状小麦花叶病毒,反转录-聚合酶链反应,单链构象多态性,小麦黄花叶病毒

自七十年代以来,在我国浙江、江苏、安徽、河南、山东、陕西、四川和湖北等省陆续发生了一种由禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)传播的小麦线状花叶病毒病^[1]。感病小麦幼叶表现为退绿到黄化的斑点,老叶则表现为花叶或坏死,病株不同程度矮化,分蘖减少,产量一般损失20~30%,重者达70%,甚至颗粒无收^[1]。播种后土温在5~13℃,有利于发病^[2]。病毒粒子呈线状,直线13~14 nm,长度200~1800 nm,其中以350~850 nm较多,外壳蛋白分子量约为30 kD, RNA有2个基因组,分子量分别为 $1.5 \cdot 10^6$ 和 $2.6 \cdot 10^6$ D^[2]。病组织中形成大量束状病毒粒子和风轮状内含体^[3]。我国各地病毒分离物与大麦黄花叶病毒(BaYMV)、日本小麦黄花叶病毒(WYMV)和美国小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)血清学紧密相关^[1,4,5]。有关此病的病原说法不一,有的认为是WYMV^[6],有的认为是WSSMV^[7,8],有的认为不同地区分别由WYMV或WSSMV所引起^[1,4]。于嘉林等^[9]对河南分离物RNA1进行局部序列分析,发现与欧洲WSSMV的同源性仅为73%。最近,我们应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和单链构象多态性技术(SSCP)对我国各地病毒进行了分析,并与法国WSSMV进行了比较。现将初步结果作一报道。

材料与方法

1 病毒分离物

1996年3月和1997年3月,分别从河南潢川、固始,四川雅安,山东烟台,陕西长安,浙江浦江,江苏扬州和湖北武汉等地病田采集具有典型发病症状的小麦叶片,-80℃贮藏备用。

收稿日期:1977-10-27,修回日期1997-12-5

* 本研究得到欧共体 INCO 项目(ERB IC18-CT96-0049),863 项目(课题编号:101-04-01-05)和浙江省青年科技人才资金等项目资助。

** 通讯联系人。

法国 WSSMV 分离物为 A. Sohn 博士提供的克隆 Mo I39^[10], 含有 RNA1 3'端 4.6 kb 序列。

2 植物总 RNA 抽提

抽提方法参见文献^[11]。

3 RT-PCR

按常规操作。

3.1 第一链 cDNA 合成

模板为病小麦叶片总 RNA, 引物 Wp₂ 用于合成 RNA1 第一链 cDNA1, 引物 116 用于合成 RNA2 第一链 cDNA2。方法参见文献^[12]。

3.2 PCR 扩增

用表 1、表 2、图 1 所列的引物, 以 cDNA1 和 cDNA2 为模板, 扩增病毒 RNA1 下游一半和 RNA2 各区域的 DNA 片段。RNA1 引物分别根据 Sohn 等^[10]和于嘉林等^[9]序列设计, RNA2 引物根据于嘉林和 Sohn(未发表)序列设计。在 50 μL PCR 反应中, 含 1 μL cDNA 模板, 20 pmol/L 引物一对, 200 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3 和 2.5 U Taq DNA 聚合酶(GIBCO)。经 94 ℃ 变性 3 min 后进行 30 循环扩增, 每个循环包括 94 ℃ 变性 1 min, 43~53 ℃ (表 1) 退火 1 min, 72 ℃ 合成 1~2 min。PCR 产物经 1% 或 1.5% 琼脂糖电泳检测。

4 SSCP-PCR 分析

方法参见文献^[12, 13]。

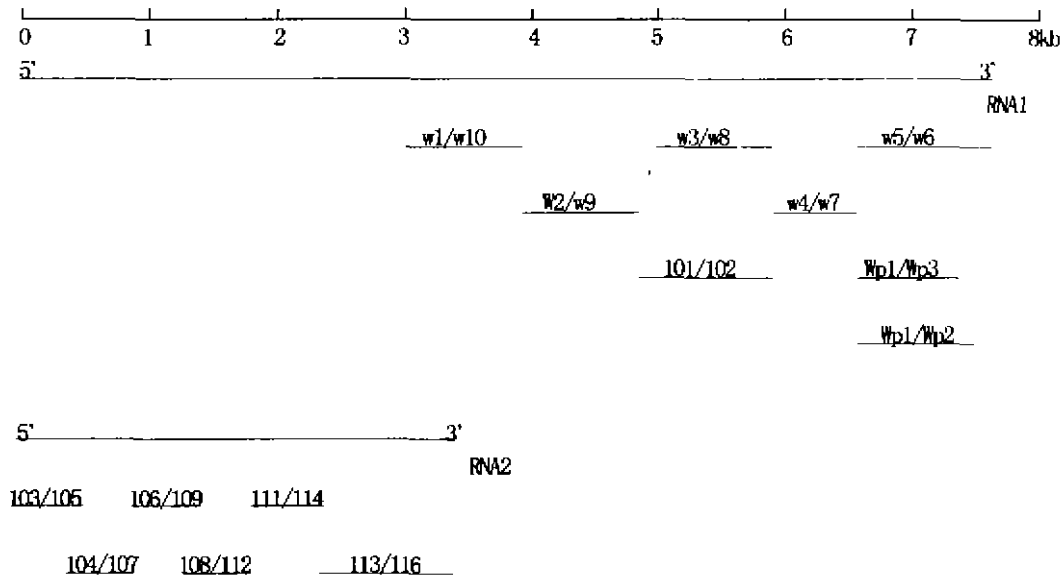


图 1 中国真菌传线状小麦花叶病毒和法国 WSSMV 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增区域示意图

Fig 1 Map of parts of genome of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus and French WSSMV amplified by RT-PCR

结 果

1 我国真菌传线状小麦花叶病毒和法国 WSSMV 的分子差异

用根据法国 WSSMV 分离物 RNA1 3'端 4.6 kb 序列^[10]设计的 5 对引物 W1/W10, W2/

表 1 用于扩增中国真菌传线状小麦花叶病毒和法国 WSSMV 基因组 RNA1 的引物

Table 1 Oligonucleotide primers used to amplify parts of RNA1 of isolates of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus and French WSSMV

引物 ^a Primers ^a	位置 Position	序列 Sequence	T _m (°C) ^c
W1(+) ^{-b}	1~17	5'-CAACCGTTTTCTCAGGA-3'	45
W2(+) ^a	961~977	5'-AATTCTTCCGCACAGCA-3'	45
W3(+) ^a	1922~1938	5'-GGTTAGCGACGATATTC-3'	45
W4(+) ^a	2864~2880	5'-TGGAGCCATTGATCTGA-3'	45
W5(+) ^a	3481~3497	5'-TGCTTGACGTTTACCGT-3'	45
W6(-) ^a	4646~4630	5'-GTTACCTTCTGGTACTC-3'	45
W7(-) ^a	3549~3533	5'-CAGTTTGTGTGCCGCA-3'	47
W8(-) ^a	2913~2897	5'-GGCAAATTGTGGTGTTTC-3'	45
W9(-) ^a	1965~1949	5'-TGGCTAATTCATCAGCC-3'	45
W10(-) ^a	1011~995	5'-TGTCAGCAACACCATCG-3'	47
101(+)	2~18	5'-gatgatAGGTGTTCAGACA-3'	49/65
102(-)	1200~1184	5'-actgCAGTCGAGCTTCCCTCT-3'	49/61
Wp1(+)		5'-aggtactATGGCAGCTGACACA-3'	41/63
Wp2(-)		5'-actgcagATTACCTTCTGGTA-3'	33/55
Wp3(-)		5'-gtctagaTTAGGTAGTTCTG-3'	33/53

^a(+)与病毒序列一致,(-)与病毒序列互补。(+)matching,(-)complementary to virus sequence.^b* 根据法国 WSSMV 序列设计^[10],其余根据河南分离物序列设计(于嘉林等^[9])。^c* designed according to French WSSMV isolate^[10]; the rest designed according to sequences of Henan^[9].^d根据 $T_m = (A + T) \cdot 2 + (G + C) \cdot 4 - 5$ 值算。calculated as $T_m = (A + T) \cdot 2 + (G + C) \cdot 4 - 5$

表 2 用于扩增中国真菌传线状小麦花叶病毒基因组 RNA2 的引物

Table 2 Oligonucleotide primers used to amplify parts of RNA2 of isolates of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus

引物 ^a Primers ^a	位置 Position	T _m (°C) ^b
103(+)	1~17	45/63
104(+)	517~536	45
105(-)	561~545	45
106(+)	1051~1067	47
107(-)	1100~1084	43
108(+)	1574~1590	45/61
109(-)	1620~1604	45/59
111(+)	2051~2067	43
112(-)	2100~2084	45
113(+)	2574~2590	45
114(-)	2567~2551	45
116(-)	3639~3614	45/71

^a(+)与病毒序列一致,(-)与病毒序列互补。

(+)matching,(-)complementary to virus sequence.

^b根据 $T_m = (A + T) \cdot 2 + (G + C) \cdot 4 - 5$ 值算。calculated as $T_m = (A + T) \cdot 2 + (G + C) \cdot 4 - 5$.

W9, W3/W8, W4/W7 和 W5/W6, 分别对法国 WSSMV RNA1 的 DNA 克隆 MoI39^[10] 和中国分离物 RNA1 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 结果都能从法国克隆 MoI39 上特异扩增预期大小的 DNA 片段。除 W1/W10 一对引物外, 其他 4 对引物不能从任何中国病毒分离物上扩增产生 DNA 片段。同样, 用根据中国河南潢川分离物 RNA1 序列^[9] 设计的 3 对引物 (101/102, Wp1/Wp2 和 Wp1/Wp3) 分别对法国 RNA1 克隆 MoI39 和中国各分离物 RNA1 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 结果只有中国各分离物产生相应的特异性 DNA 片段, 而不能从法国 DNA 克隆上产生特异性片段(表 3)。这些结果表明, 我国真菌传线状小麦花叶病毒 RNA1 序列与法国 WSSMV 分离物存在较大差异。

表3 中国真菌传线状小麦花叶病毒和法国 WSSMV RNA1 RT-PCR 扩增

Table 3 RT-PCR Amplification of parts of RNA1 of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus and French WSSMV

引物对 Primers	片段大小 Size(bp)	PCR 片段 ^a PCR fragment ^a	
		法国 French	8 个中国分离物 8 Chinese isolates
W1/W10	1011	+	(+) ^b
W2/W9	1005	+	-
W3/W8	992	+	-
W4/W7	686	+	-
W5/W6	1166	+	-
101/102	1200	-	+
Wp1/Wp2	1089	-	+
Wp1/Wp3	830	-	+

! + 表示可扩增得到预期片段; - 表示扩增不到预期片段。

+ fragment; - no fragment obtained.

! 中国分离物扩增到的都为约 800 bp 片段。fragment of about 800bp produced from all Chinese isolates.

2 中国真菌传线状小麦花叶病毒各分离物之间的分子差异

2.1 RNA1 的同源性比较

根据中国河南潢川分离物 RNA 序列^[9]设计的 3 对引物(101/102, Wp1/Wp2, Wp1/Wp3)分别对河南潢川、河南固始、四川雅安、山东烟台、陕西长安、浙江浦江、江苏扬州、湖北武汉 8 个分离物进行 RT-PCR 反应,均能扩增到预期的 1200 bp, 1089 bp 和 830 bp 的特异性 DNA 片段(表 3)。这些结果表明,我国供试的 8 个病毒分离物的 RNA1 同源性较强,所选择的 3 对引物均能与各分离物 RNA1 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。对 3 对引物扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析,只有 Wp1/Wp3 扩增的外壳蛋白基因(830bp)可以区分开,8 个病毒分离物泳动图谱均不同。表明供试的 8 个病毒分离物 RNA1 之间虽然同源性较强,但还是存在着一定的序列差异,且无一彼此完全相同。但是,另外两组 PCR 片段(1200 bp 和 1089 bp)均不能用 SSCP 加以区分。这可能是 PCR 片段太大,SSCP 分离效果不佳之故。

2.2 RNA2 的同源性比较

对河南病毒 RNA2 特异的 6 对引物分别对中国各分离物进行 RT-PCR 反应,除引物 106/109 外,其余各对引物都分别扩增到预期的特异 DNA 片段(表 4)。图 2 是引物对 108/112 从各分离物 RNA2 模板上 RT-PCR 扩增的产物。引物 106/109 可扩增河南潢川、山东烟台、浙江浦江、湖北武汉分离物,不能扩增河南固始、四川雅安、陕西长安、江苏扬州等分离物,表明中国各分离物 RNA2 的同源性比较强,但其序列也存在差异。引物 106/109 扩增证实了这一点。对由引物 103/105、104/107、108/112、111/114 扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析,发现各分离物的泳动图谱均不相同,图 3 是由引物 108/112 扩增的 PCR 产物进行的 SSCP 图谱分析。虽然它们的双链 DNA 片段大小一致,但是 SSCP 分析进一步证实中国各分离物之间的 RNA2 序列存在差异。

表 4 中国真菌传线状小麦花叶病毒分离物 RNA2 RT-PCR 扩增
Table 4 RT-PCR amplification of parts of RNA2 of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus

引物 Primers	片段大小 Size(bp)	病毒分离物 Virus isolates								
		潢川 HC	固始 GS	雅安 YA	烟台 YT	长安 CA	浦江 PJ	扬州 YZ	武汉 1 WH1	武汉 2 WH2
103/105	567	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104/107	584	+	+	+	+	+	+	+	+	+
106/109	570	+	-	-	+	-	+	-	+	+
108/112	533	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111/114	517	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113/116	1074	+	+	+	+	+	-	+	+	+

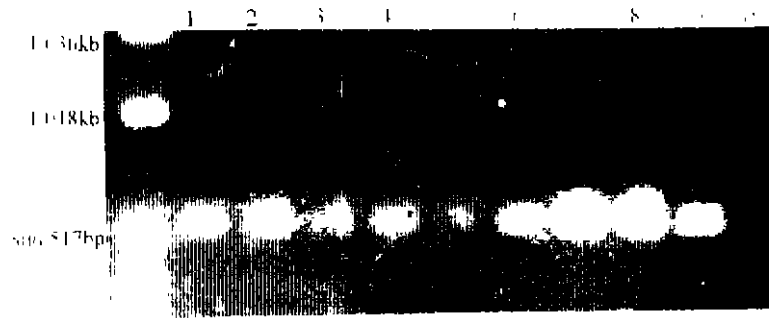


图 2 用引物对 108/112, 从中国真菌传线状小麦花叶病毒各分离物进行 PCR 扩增结果
Fig 2 PCR products of fragment amplified from cDNA2 of isolates of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic virus by primers 108/112

1. 潢川 Huangchung 2. 固始 Gushi 3. 雅安 Yaa 4. 烟台 Yantai 5. 长安 Changan 6. 浦江 Pujiang 7. 扬州 Yangzhou 8. 武汉 1 Wuhan 1 9. 武汉 2 Wuhan2 10. 健麦 Healthy wheat



图 3 用引物对 108/112 从中国真菌传线状小麦花叶病毒各分离物中扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析
Fig 3 SSCP analysis of PCR products amplified from isolates of Chinese fungal-transmitted filamentous wheat mosaic viruses by primers 108/112

1. 武汉 1 Wuhan 1 2. 武汉 2 Wuhan 2 3. 扬州 Yangzhou 4. 浦江 Pujiang 5. 长安 Changan 6. 烟台 Yantai 7. 雅安 Yaa 8. 固始 Gushi 9. 潢川 Huangchung 10. 潢川(未变性) Huangchung (undenatured)

讨 论

从我国四川、湖北、陕西、江苏、河南和山东各病区采集的真菌传线状小麦花叶病毒分离物,用日本 WYMV 抗血清和美国 WSSMV 抗血清进行 ELISA 和 ISEM 检测表明,彼此血清学紧密相关(结果未显示)。根据河南潢川分离物 RNA1 和 RNA2 序列设计的共 9 对引物进行 RT-PCR 反应,除 1 对引物(106/109)外,其他 8 对引物均能在全部分离物上扩增到预期大小的 DNA 片段,而引物 106/109 只能扩增河南潢川、山东烟台、浙江浦江和 2 个湖北武汉分离物,不能扩增其他几个分离物。用每对引物扩增的 PCR 产物,大小一致,无法用常规电泳区别,但经 SSCP 分析,则表现彼此各不相同的泳动图谱。这些结果表明,我国真菌传线状小麦花叶病毒属同一种病毒,序列与潢川分离物高度同源,但各分离物 RNA1 和 RNA2 序列存在变异,彼此无一完全相同。这与大麦黄花叶病毒(BaYMV)结果相似^[12,13],从而分子变异可能是大麦黄花叶病毒属的特征。

根据法国 WSSMV RNA1 序列设计的 5 对引物,只能扩增法国 WSSMV,而除引物 W1/W10 外,其它 4 对引物不能扩增中国分离物。同样,根据中国河南潢川病毒 RNA1 序列设计的 3 对引物也只能扩增中国分离物,而不能扩增法国 WSSMV。另外,在我们和德国 A. Sohn 博士合作开展的一些工作中,根据法国 WSSMV 序列合成的引物 4000/4001,只能扩增法国、美国和加拿大分离物的外壳蛋白基因,而不能扩增我国扬州分离物。同样,用我国河南分离物序列设计的引物 S6/5674,只能扩增我国分离物的外壳蛋白基因,而不能扩增其他国家的分离物的外壳蛋白基因。进一步序列分析比较结果表明,法国、美国和加拿大的 WSSMV 外壳蛋白基因同源性高达 96% 以上,氨基酸序列完全一致。可是我国分离物外壳蛋白同源性同欧美 WSSMV 相比,仅为 75% 左右,与大麦黄花叶病毒(BaYMV)和法国 WSSMV 外壳蛋白同源性(74%)^[10]相似(详细结果另文发表),表明中国病毒与法国、美国、加拿大 WSSMV 的序列存在较大的差异。于嘉林报道^[9]中国河南潢川病毒 RNA1 3'端 1 kb 与法国 WSSMV^[10]相对应区域的同源性为 73%,与日本 WYMV 相对应区域的同源性为高于 90%,从而认为我国真菌传小麦线状花叶病病原与日本小麦黄花叶病毒(WYMV)相似。鉴于上述核酸序列分析比较,我们认为欧美 WSSMV 与日本报道的 WYMV 为两种不同的病毒,我国真菌传线状小麦花叶病病原为小麦黄花叶病毒。

此外,根据 Shukla 和 Ward^[14,15]的报道,马铃薯 Y 病毒科成员中,外壳蛋白的核心区同源性:75~88% 为不同病毒,90~100% 为同种病毒不同株系。在大麦黄花叶病毒属中,根据已有的序列^[6]发现 BaMMV、WSSMV 和 WYMV 彼此同源性为 75% 左右,而 BaMMV 与 BaYMV、WSSMV 或 WYMV 的同源性仅为 39%。这进一步表明它们是不同的病毒。

SSCP-PCR 是一种快速区分检测基因组之间微小差异的有效方法。当双链 DNA(如 PCR 产物)的正负链经 70℃ 处理或碱变性后,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 重演性好,只要控制好电泳温度,就能获得稳定的图谱。SSCP 分析对于较小片段(如 500 bp 左右)分离效果较好,对于较大片段(如大于 1 kb),可能由于 DNA 二级结构缘故,分离效果欠佳。这一点在本文也得到了证实 Orita 等^[16]报道应用这种技术可以检测两个 DNA 片段中一个碱基的差异。但也有报道^[11]认

为,序列的差异与 SSCP 构象之间并没有简单的对应关系,有时 2~3 个碱基的差异也能引起 SSCP 构象的不同,有时 29 个碱基的差异也不能引起 SSCP 构象的不同。至于供试的 RT-PCR 片段中,各分离物之间存在多少个碱基的差异,则有待进一步的序列分析测定。

另一个值得讨论的问题是,引物 W1/W10 扩增法国分离物有两个片段,一个 1 011 bp(预期片段),一个约 700 bp 的片段,如退火温度高(53 ℃),则得到的大片段多些,退火温度低(43 ℃),则得到的小片段多些。而中国分离物不管退火温度高低都只得到约 800 bp 的片段。引起这种结果的原因,还有待进一步研究。目前我们对这种结果有两种假设,一是因为 cDNA 的二级结构造成,另一种假设就是因为缺失突变所致。

致谢 感谢中国农业大学于嘉林教授允许引用未发表的河南小麦黄花叶病毒 RNA2 序列。

参 考 文 献

- 1 陈剑平,阮义理,董玛佳.我国一些地区发生的小麦土传病毒病原研究.病毒学杂志,1989,(2):176~181
- 2 Chen J Occurrence of fungally transmitted wheat mosaic viruses in China Ann. Appl. Biol, 1993, 123:55~61
- 3 阮义理,陈剑平,洪健.小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)和小麦黄花叶病毒(WYMV)的细胞质内含体的电镜观察.植物病理学报,1991,21(3):165~171
- 4 陈剑平,阮义理,洪健等.应用免疫吸附电镜技术研究三种真菌传线状病毒的血清学关系.病毒学报,1990,6(3):239~244
- 5 陈剑平,阮义理,龚祖坝等.小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)提纯、粒子性质和血清学物病理学报,1990,20(1):5~12
- 6 林美琛,阮义理.小麦黄花叶病(WYMV)的研究.植物病理学报,1986,16(2):73~78
- 7 周广和,陈剑波,陈善铭等.河南小麦梭条斑花叶病原鉴定、病毒提纯及其特性.病毒学报,1989,5(1):46~51
- 8 侯庆树,韩红,周益军等.江苏省一种小麦土传病毒的研究 I.发病规律与病原鉴定.江苏农业学报,1985,1(3):25~28
- 9 于嘉林,晏立英,冯继东等.一种中国发生的真菌传小麦花叶病毒 RNA-1 3' 末端核苷酸序列分析.病毒学报,1995,11(3):248~254
- 10 Sohn A, Schenk P, Signoret P A *et al.* Sequence analysis of the 3'-terminal half of RNA1 of wheat spindle streak mosaic virus. Arch Virol, 1994, 135:279~292
- 11 Chen J, MacFarlane S T. Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus RNA2 associated with increased symptom severity. Virology, 1994, 202:921~929
- 12 Shi N N, Chen J, Wilson T M A *et al.* Single-strand conformation polymorphism of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. Virus Research, 1996, 44:1~9
- 13 施农农,陈剑平.应用单链构象多态性-聚合酶链反应研究我国大小麦黄花叶病毒株系的分化.中国病毒学,1996,11(2):170~175
- 14 Shukla D D, Ward C W. Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for the identification and classification of the potyvirus group. J Gen Viro, 1988, 69:2703~2710
- 15 Shukla, D D, Ward C W. Structure of polyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. Adv Virus Res 36:273~314
- 16 Orta M, Suzuki Y, Sekiya T *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989, 5:874~879

Identification of Chinese Fungal-transmitted Filamentous Wheat Mosaic Virus by RT-PCR and SSCP

Lei Juanli Chen Jiong Chen Jianping* Zheng Tao Chen Ye

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

There are two filamentous wheat mosaic viruses transmitted by the plasmodiophoraceous fungus *Polymyxa graminis*: one is wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) first reported in Canada and the other is wheat yellow mosaic virus (WYMV) first reported in Japan. These viruses are very similar in particle morphology, biological and serological properties, but different in genomic sequences. The results of RT-PCR and single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) indicated that the fungal-transmitted filamentous wheat mosaic viral pathogen occurred in successive crops at different sites in China is wheat yellow mosaic virus. SSCP analysis with the fragments amplified using several primer sets all gave different patterns, indicating the presence of sequence variations among eight isolates collected at different sites in China.

Key words Fungal-transmitted wheat mosaic virus, RT-PCR, Single-strand conformation polymorphisms, Wheat yellow mosaic virus

* Corresponding author