

# 小麦黄花叶病毒低分子量 RNA1 的鉴定\*

杨 军<sup>1</sup>, 张卫华<sup>1</sup>, 尚巧霞<sup>2</sup>, 翟亚峰<sup>1</sup>, 韩成贵<sup>1,2\*\*</sup>, 李大伟<sup>1</sup>, 于嘉林<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 2. 中国农业大学植物病理学系, 北京 100094)

## Identification of a Low Molecular Weight Component of Wheat

### Yellow Mosaic Virus RNA1 in Infected Wheat

YANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Wei-hua<sup>1</sup>, SHANG Qiao-xia<sup>2</sup>, ZHAI Ya-feng<sup>1</sup>,

HAN Cheng-gui<sup>1,2\*\*</sup>, LI Da-wei<sup>1</sup>, YU Jia-lin<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Agrabiotechnology; 2. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Repeated passage of several fungus-transmitted plant viruses can lead to sequence deletion in their hosts. In this paper, Northern blotting analysis revealed that a low molecular weight component of *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV) RNA1 was detected after the twelfth passage of mechanical inoculation in wheat plants associated with exacerbate symptoms displayed and exist stably in the inoculated plants to the 26th passage in the experiment. However these low molecular weight RNAs could not be detected in the particles purified from the same infected samples, suggesting that they could not be encapsidated in infected wheat. Sequence analysis showed that a contiguous segment of 2380 nucleotides (nt68 to nt2448) was internally deleted from the WYMV RNA1 and flanked by direct repeats of six nucleotides CGTCTC, which supports the "copy choice" model as the possible mechanism of the generation of this low molecular weight component of WYMV RNA1.

**Key words:** *Wheat yellow mosaic virus*; Low molecular weight RNA1; The copy choice model

**摘要:** 利用小麦黄花叶病毒 (*Wheat yellow mosaic virus*, WYMV) 潢川分离物连续继代机械接种感病小麦品种鄂恩 1 号, 经继代接种 12 代以上的小麦症状明显加重, Northern blot 检测发现一条明显的低分子量病毒 RNA1 (LMW RNA1), 并在随后至 26 代的继代接种发病材料中稳定存在, 但在利用同样病叶提纯的病毒粒子内检测不到 LMW RNA1, 表明其不能被包装到病毒粒子内。序列分析结果表明, 低分子量 RNA1 由病毒 RNA1 发生内部缺失而产生, 从 RNA1 5 端非编码区 (第 68nt) 到 CI 基因编码区的 3 端 (第 2448nt) 共缺失 2380 个核苷酸, 在缺失区域两端的结合位点存在六个碱基的正向重复序列 CGTCTC。据此对此低分子量 RNA1 的缺失机制进行了讨论, 认为由一种模板转换机制导致了缺失的发生。

**关键词:** 小麦黄花叶病毒; 低分子 RNA1; 模板转换机制

**中图分类号:** S 432.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5125 (2005) 02-0179-05

小麦黄色花叶病毒 (*Wheat yellow mosaic virus*, WYMV) 造成的黄花叶病 (亦称“梭条花叶病”), 在我国及亚洲许多小麦产区均有不同程度发生危害<sup>[1]</sup>。自然条件下 WYMV 可由禾谷类多粘菌 (*Polymyxa graminis*) 作为传播介体, 在土壤中借

助水流传播并长期存活。P. *graminis* 产生的休眠孢子堆抗逆性强, 在土壤中可以存活多年而仍然具有传播病毒的能力<sup>[3,4]</sup>。目前对该病害的治理控制除利用抗性小麦品种外尚缺乏有效手段。

WYMV 是一种二分体正链 RNA 病毒, 病毒基

收稿日期: 2004-08-23, 修回日期: 2004-11-10

\* 基金项目: 973 资助项目 (G2000016201)

作者简介: 杨军, 男, 河南罗山人, 理学博士, 主要研究方向植物病毒学。现工作单位: 中国烟草总公司郑州烟草研究院。

\*\* 通讯作者。Corresponding author. E-mail: hanchenggui@cau.edu.cn

因组含有 RNA1 (7644 个核苷酸) 和 RNA2 (3651 个核苷酸) 两个组分<sup>[2,3]</sup>。该病毒归属为马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviriidae*)、大麦黄花叶病毒属 (*Bymovirus*)。就目前已有报道, WYMV 与其它马铃薯 Y 病毒科或小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 病毒采用相类似的策略进行复制与表达, 即都是以单一或多组分的全长正链基因组 RNA 为模板, 翻译产生多聚蛋白 (Polyprotein) 后, 进而切割形成各种较小的功能蛋白。复制或翻译过程中未发现类似于亚基因组的小分子 RNA, 或与产生低分子 RNA 有关的剪切、拼接机制。

然而, 真菌传植物病毒在连续机械接种条件下经常地会自发缺失, 产生与全长基因组 RNA 相比分子量较小的突变型 RNA 片段。例如, 由 *P. graminis* 传播的土传小麦花叶病毒 (SBWMV) RNA2 的 CP 基因通读区域可以自发的产生内部缺失<sup>[11]</sup>; 大麦和性花叶病毒 (BaMMV) 经机械摩擦接种导致 RNA2 P2 基因的 3 端也能自发地产生缺失<sup>[12]</sup>, 并且往往伴随着寄主植物的症状变化。本文报道了在 WYMV 中发现的一种新的小分子 RNA1, 在核苷酸序列分析的基础上, 对其产生的机制和功能进行了讨论。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒源与接种

具有明显黄色花叶症状的感病小麦样品采集于河南省潢川县, 经酶联免疫反应 (ELISA) 确认含有 WYMV 后, 新鲜小麦或 -80 °C 冰冻叶片用于机械接种。取显症小麦叶片, 剪碎后加入适量磷酸缓冲液 (0.02M, pH 7.2) 及金刚砂研磨, 在待接种小麦叶片上喷撒金刚砂后, 进行摩擦接种。供试感病小麦品种鄂恩 1 号, 经 25 °C 下培养 5~6d、14 °C 培养 2~3d 后作为接种材料。接种后, 首先在 18~20 °C 的光照培养箱中黑暗培养 20hr 左右, 随后转入低温 (11~13 °C) 条件下光照培育 (16h/d)。待小麦植株发病后, 采集病叶用同样方法连续进行病毒继代机械接种, 获得高代次病毒 (Pn)。

### 1.2 载体和菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 株由本室保存; 质粒载体 pGEM-T easy vector 载体购自美国 Promega 公司。

### 1.3 寡聚核苷酸引物

根据报道的 WYMV RNA1 核苷酸序列 (中国分离物: AF067124; 日本分离物: D86634) 设计并合成引物。其中除 WY-65 为赛百盛公司合成外, 其余

引物均来自于上海 Sangon 公司。

### 1.4 WYMV 低分子 RNA1 的 Northern blot 分析

WYMV 接种发病小麦总 RNA 样品经甲醛/甲酰胺变性处理, 采用含甲醛的 1.2% 变性琼脂糖凝胶分离, 利用毛细管法, 经 20 ×SSC 转移至 Hybond-H<sup>+</sup> 尼龙膜 (Amersham Pharmacia 公司)。PCR 扩增 WYMV RNA1 cDNA 克隆中 5 385nt-6 490nt 片段 (1.2kb), 电泳回收后采用随机引物试剂盒并按照厂家提供的方法 (Promega), 用  $\sim^{32}$ P-dCTP 进行同位素标记作为特异性探针进行 Northern blot 检测分析。并对同样接种病叶提纯病毒的 RNA 进行了检测分析。

### 1.5 小麦黄色花叶病毒的 RT-PCR 检测

以接种 WYMV 的发病小麦叶片为材料, 抽提总 RNA 为模板, 在 30μL 反应体系中含有 2-3μg 的总 RNA、15 单位的 AMV 逆转录酶或 200 单位的 M-MLV 逆转录酶、50 单位的 RNasin、3μL 0.1mol/L DTT、1μL 10mM dNTPs 和 2μg 的引物, 42 °C 保温 1.5-2h。以 2μL 的反转录产物为模板, 在 50μL 的反应体系中含有 5 单位 Taq DNA 聚合酶、上下游引物各 0.1μg 和 1μL 5mmol/L dNTPs, 进行 PCR 扩增。扩增循环条件为 94 °C 变性 30sec, 56 °C 复性 30sec, 72 °C 延伸 3min, 30~35 个循环。利用覆盖整个 RNA1 的不同引物对组合进行检测 (见图 1)。其中引物 WY42: 5'-CGGAAT TCTAATCGTTTGATTGT AGTTC-3 (与 RNA13 298-3 316nt 相互补), 引物 WY65: 5'-GCTAACACATACCTTCTGCTTCC-3 (与 RNA1 39-61nt 相对应), 并以 WYMV RNA1 全长体外转录物作为 RT-PCR 的模板对照。

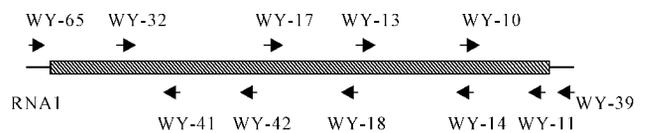


图 1 部分引物在 WYMV RNA1 上的相对位置

Fig. 1 Corresponding location of primers in WYMV RNA1

### 1.6 WYMV 低分子 RNA1 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 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接到 pGEM-T 载体 (Promega) 上。利用 ABI377A 型 DNA 自动测序仪对重组质粒进行核苷酸序列测定, 应用软件 DNAMAN (Lynnon Bio-Soft) 进行序列分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 WYMV RNA1 的 RT-PCR 分析

以田间采集病叶和经 WYMV 继代接种后发病的小麦病叶为材料,提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测。用覆盖整个 WYMV RNA1 的 6 对引物进行 PCR 扩增,其中 RNA1 3 端大部分区域没有检测到与对照相比的差异性扩增条带(图略)。而在 RNA1 的 5 端区域,当采用 WYMV RNA1 引物对 WY65 与 WY42 时,除了能够扩增出一条正常长度的片段(3.3kb)以外,还有一条约 1.0kb 的感病植株总 RNA 特有的差异条带,并且无论在田间感病植株或经多次继代接种的发病小麦中都有存在(图 2,泳道 2-4)。

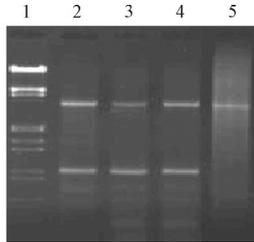


图 2 WYMV RNA1 的 RT-PCR 检测

Fig.2 RT-PCR detection of WYMV RNA1

1, DNA / *EcoRI*+ *Hind* ;2, P21, the twenty-first passage of mechanical inoculation;3, P20, the twentieth passage of mechanical inoculation;4, Infected wheat collected from field; 5, RNA1 full-length *in vitro* transcripts; \* Note: used primers are WY42 + WY65

为了排除在 RT-PCR 过程中产生缺失产物的可能性,利用 WYMV RNA1 全长 cDNA 克隆的体外转录物作为模板进行 RT-PCR。结果表明,以全长 RNA1 体外转录物为模板的 RT-PCR 只能够扩增出正常大小片段,而无其他明显的缺失片段产生(图 1,泳道 5)。说明以上缺失片段并非是由 RT-PCR 过程中所产生,而是来自于 WYMV 发病材料中存在的低分子量 WYMV RNA1 模板(low molecular weight RNA1,LMW RNA1)。

### 2.2 继代接种小麦的 Northern blot 分析

为了进一步验证 RT-PCR 方法所检测到的低分子量 WYMV RNA1,采用 WYMV RNA1 特异性探针进行了 Northern blot 分析。结果显示,在高代次接种小麦中(P12、P21、P23、P25),杂交信号显示除正常大小的 RNA1 分子外,还存在一个较小的 RNA 杂交条带,而在低代次或大田发病材料中则检测不到它的存在(图 3)。这一结果说明 WYMV 在田间这种低分子量 RNA 尽管存在,但数量很低,经继代接种后,其 RNA1 组份出现了大量与全长 RNA1 并存的低分子量 WYMV RNA1。而相同样品通过初步提纯病毒后再提 RNA 的 Northern 分析表明这种缺失型低分子量 RNA 不能被包装到病毒粒子内,只存在于病组织体内(图略)。

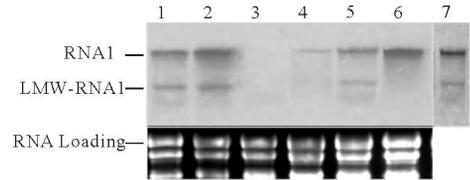


图 3 继代接种 WYMV LMW-RNA1 的 Northern blot 分析  
Fig.3 Detection of WYMV LMW-RNA1 during repeated passage inoculation by Northern blot

1, P25; 2, P23; 3, healthy wheat; 4, P0; 5, P21; 6, Transcript of WYMV-RNA1; 7, P12.

### 2.3 WYMV D-RNA 克隆与序列分析

采取的 PCR 策略及引物位置见图 4a。分别将引物 WY42 和 WY65 扩增出的小片段克隆连接到 pGEM-T 载体上,以 M13 正反向引物进行序列测定。序列分析结果表明,低分子量病毒 RNA 从 RNA1 5 端非编码区第 68nt 处直至 CI 基因 3 端编码区第 2448nt 处发生缺失,缺失片段大小为 2380nt,在缺失位置的 5 端和 3 端结合位点处存在 CGTCTC 六个碱基的径向重复序列(见图 4 b)。

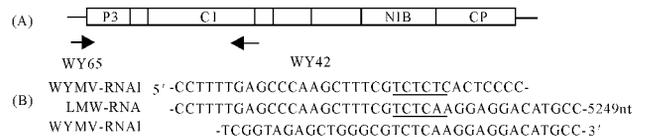


图 4 RT-PCR 引物在基因组上的位置及 WYMV LWM-RNA1 缺失位点序列特征

Fig.4 Genome organization of WYMV RNA1 and location of primers(A);Diagram of the nucleotide sequence at the junction site (underlined) and at the flanking regions of the full-length RNA1 and LMW-RNA(B).

## 3 讨论

本文报道了小麦黄色花叶病毒(WYMV) RNA1 的内部缺失现象。通过机械接种,长期在感病小麦上继代转接小麦黄色花叶病毒,在连续继代机械接种至第 12 代(P12)就能检测到低分子量 WYMV RNA1 分子,并且在随后的继代接种材料中稳定存在。伴随着低分子量 WYMV RNA1 分子的出现,机械接种感病小麦症状加重,发病时间缩短,病毒表现出较强的致病性。在含低分子量 RNA 的接种发病材料中,同时存在全长野生型的病毒 RNA1 分子,这种低分子量 WYMV RNA1 与全长 RNA1 分子共存的现象,可解释为:在机械接种时,由于选择压力的改变,在自然条件下靠真菌介体传播的 WYMV 改为人工机械接种传播,通过机械摩擦造成的小麦叶片伤口为 WYMV 建立直接侵染优

化了条件,不存在真菌传播介体对低分子量 RNA 分子产生的选择压力-类似于一种“反复瓶颈效应事件”(repeated bottleneck events)的正选择作用机制<sup>[13]</sup>,从而在一定程度上促进、积累小麦黄色花叶病毒缺失型低分子量 WYMV RNA1 的产生。

对于产生缺失的机制目前尚不十分清楚,研究表明许多动物和植物病毒重组或者缺失可能采用一种模板转换机制(template-switching mechanism):病毒 RNA 在复制过程中,复制酶-初生链复合物从模板的一点转向(switching)到相同或另外一个 RNA 分子模板的下游继续复制,从而产生病毒缺失型 RNA (defective RNAs, D-RNAs) 或者缺失干扰型 RNA (defective interfering RNAs, DI-RNAs)<sup>[14-16]</sup>。研究发现,一般在缺失 RNAs 分子的 5' 端和 3' 端连接位点的侧翼或者邻近区域,存在 4-10nt 的碱基序列重复<sup>[11,14]</sup>。这些含短病毒基因组 RNA 分子同样被包装进病毒粒子,包含一端或两端 RNA 序列,能够与作为辅助病毒的紧密相关病毒相竞争,主要表现在病毒复制水平上。

对低分子量 WYMV RNA1 的序列分析发现,缺失发生在 RNA1 的 5' 端非编码区,直到病毒 CI 基因 ORF 的 3' 端,缺失位置 nt68-nt2448,在缺失 RNA1 分子 5' 端和 3' 端连接位点存在 CGTCTC 的六个碱基径向重复(图 5a)。据此可对此低分子量 RNA 的缺失机制推测如下:(1)在以 WYMV RNA1(-)链分子为模板合成病毒 RNA(+)链时,当 RNA(+)链合成到 59~90 nt 区域时,由于碱基序列互补,在 RNA1(-)分子内或者分子间形成稳定的茎环状(stem-loop)或者类似异源双链结构,复制酶-RNA(+)链复合物解离初始模板,RNA(+)初生链转向模板的 5' 端或者另外一个 RNA(-)链分子,大致在 RNA1(+)分子的 2436~2467nt 区域重新起始 RNA1(+)的合成(见图 5b);(2)在以 WYMV RNA1(+)链分子为模板合成病毒 RNA(-)链时,当 RNA(-)链合成到 2436~2467nt 区域时,由于碱基序列互补,在 RNA1(+)分子内或者分子间形成稳定的茎环状(stem-loop)或者类似异源双链结构(heteroduplex structure),复制酶-RNA(-)链复合物解离初始模板,RNA(-)初生链转向模板的 5' 端或者另外一个 RNA(+)链分子,大致在 RNA1(-)分子的 59-90 nt 区域重新起始 RNA1(-)的合成。序列分析发现在结合区域含有丰富的 GC/AU 序列,据认为能够降低形成异源双链结构的序列精确性,引发缺失事件的发生<sup>[17-19]</sup>(见图 5c)。

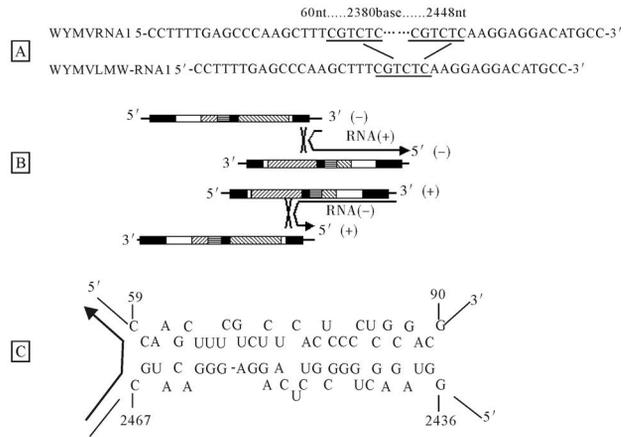


图 5 WYMV 低分子量 RNA1 产生机制的推测模型

Fig. 5 Schematic diagram of the proposed model for generation of WYMV LMW-RNA1

A: The nucleotide sequence at the junction site (underlined) and at the flanking regions of the full-length RNA1. B: Templating-shift during synthesis of plus-strand RNA1. C: A heteroduplex formed by intra-molecular or inter-molecular base-pairing of plus-strand RNA1 and the site of G/U-rich region which may potentially induce a recombination event.

许多病毒缺失型/缺失干扰型 RNA 能够影响野生辅助病毒的复制与症状表现,我们的研究结果也发现伴随着缺失型低分子量病毒 RNA1 (LMW-RNA1) 的存在,接种小麦发病症状明显加重。小麦黄色花叶病毒低分子量 RNA1 看来是源于一种单一缺失突变体,在连续继代机械接种的过程中,为什么不进行进一步的病毒 RNA 基因组重组或者重排?低分子量 RNA1 的存在伴随着发病症状明显加重,这种促进症状发展的调控机制是什么?它在小麦黄色花叶病毒侵染和致病过程中的生物学作用究竟如何?进一步研究病毒低分子量 RNA1 在病毒侵染发病过程中的生物学功能以及与辅助病毒之间的关系,对于在病毒侵染过程中病毒缺失型或者缺失干扰型 RNA (D/DI-RNAs) 的作用将会有有一个比较准确的理解和认识。

## 参考文献

- [1] Davidson A D, Profs M, Schell J, *et al.* The nucleotide sequence of RNA2 of barley yellow mosaic virus[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 989-993.
- [2] Namba S, Kashiwazaki S, Lu X, *et al.* Complete nucleotide sequence of wheat yellow mosaic bymovirus genomic RNAs [J]. Arch Virol, 1998, 143: 631-643.
- [3] Li D, Yan L, Su N, *et al.* The nucleotide sequence of a Chinese isolate of wheat yellow mosaic virus and its comparison with a Japanese isolate [J]. Arch Virol, 1999, 144: 2201-2206.
- [4] Adams M J, Swaby A G, Macfarlane I. The susceptibility of

- barley cultivars to barley yellow mosaic virus (BaYMV) and its fungal vector, *Polymyxa graminis* [J]. *Ann Appl Biol*, 1986, 109: 561-572.
- [5] Hillman B I, Carrington J C, Morris T J. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome[J]. *Cell*, 1987, 51: 427-433.
- [6] Scholthof, K B, Scholthof H B, Jackson A O. The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of tomato bushy stunt virus proteins and implications for disease attenuation[J]. *Virology*, 1995, 211: 324-328.
- [7] Romero J, Huang Q, Pogany J *et al.* Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections [J]. *Virology*, 1993, 194: 576-584.
- [8] Li X H, Heaton L A, Morris T J, *et al.* Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated de novo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9173-9177.
- [9] Graves M V, Roossinck M J. Characterization of defective RNAs derived from RNA3 of the Fny strain of cucumber mosaic cucumovirus[J]. *J Virol*, 1995, 69: 4746-4751.
- [10] Ayllón M A, López C, Navas-Castillo, *et al.* New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 817-821.
- [11] Chen J, Macfarlane S A, Wilson T M A. Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus RNA2 associated with increased symptom severity[J]. *Virology*, 1994, 202: 921-929.
- [12] Dessens J T, Nguyen M, Meyer M. Primary structure and sequence analysis of RNA2 of a mechanically transmitted barley mild mosaic virus isolate: An evolutionary relationship between bymo- and furoviruses [J]. *Arch. Virology*, 1995, 140: 325-333.
- [13] Domingo E, Holland, J J. RNA virus mutation and fitness for survival[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 151-178.
- [14] Nagy P D, Simon A E. New insights into the mechanisms of RNA recombination[J]. *Virology*, 1997, 235: 1-9.
- [15] 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.
- [16] Damayanti T A, Nagano H, Mise K, *et al.* Brome mosaic virus defective RNAs generated during infection of barley plants[J]. *J Gen. Virology*, 1999, 80: 2511-2518.
- [17] Nagy P D, Bujarski J J. Homologous RNA recombination in brome mosaic virus: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers[J]. *J Virol*, 1996, 70: 415-426.
- [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] Hernandez C, Carette J E, Brown D J F, *et al.* Serial passage of Tobacco Rattle Virus under different selection conditions results in deletion of structural and nonstructural genes in RNA2[J]. *J Virol*, 1996, 70: 4933-4940.