

水稻条纹病毒云南分离物病害特异性 蛋白基因的分子变异

李 凡, 杨金广, 龙亚芹, 陈海如

(云南农业大学 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要:对采自云南大理、陆良、禄劝、石林、玉溪、保山和宜良等地的水稻条纹叶枯病病样,提取病叶总 RNA,经 RT-PCR、cDNA 克隆和序列测定,获得了水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)7 个云南分离物的 *SP* 基因序列,核苷酸长为 537 nts,并与 GenBank 中已报道的 RSV *SP* 基因进行同源性比较,综合分析了云南 RSV 不同分离物 *SP* 基因的分子变异. 对纤丝病毒属 6 种病毒的 *SP* 蛋白氨基酸序列进行进化分析,结果表明 RSV 与 MSV 亲缘关系最近,与 RGSV 亲缘关系最远.

关键词:水稻条纹病毒; 病害特异性蛋白基因; 分子变异; 纤丝病毒属

中图分类号: S432.4; S435.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)03-0028-04

Molecular Variation of the Disease-Specific Protein Gene of the Isolates of *Rice stripe virus* in Yunnan

LI Fan, YANG Jin-guang, LONG Ya-qin, CHEN Hai-ru

(Key Lab of Agricultural Biodiversity for Pest Management of Ministry of Education,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The *SP* gene of *Rice stripe virus* (RSV) isolates collected from Dali, Luliang, Luquan, Shilin, Yuxi, Baoshan and Yiliang of Yunnan Province was amplified by RT-PCR. The amplicons were then cloned and sequenced. Sequence analysis showed that the *SP* gene was comprised of 537 nucleotides. Molecular variation of the *SP* gene of the seven RSV isolates was analyzed and compared with that of other RSV isolates released in GenBank. Comparison of the amino acid sequences of the *SP* gene of different viruses demonstrated that RSV was most closely related to *Maize stripe virus* (MSV), and RSV has the farthest relationship to *Rice grassy stunt virus* (RGSV) in the genus *Tenuivirus*.

Key words: *Rice stripe virus*; disease-specific protein gene; molecular variation; *Tenuivirus*

由水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)引起的水稻条纹叶枯病于 20 世纪初始发于日本关中一带, 1963 年在我国苏、浙、沪一带首次爆发成灾, 现已扩展蔓延到全国 18 个省、市、自治区的水稻种植区^[1-2]. 2000 年以来, 该病在江苏、河南等地多次爆发成灾, 重病田块的发病率超过 50%, 严重制约了当

地的稻米生产, 已成为该地区水稻主要病害之一^[3-4]. 水稻条纹叶枯病于 1979 年在云南大姚、姚安等地首次爆发, 据笔者 2002—2005 年多次实地调查, 发现该病已广泛分布于云南滇中和滇西一带粳稻种植区, 在滇东一带也有零星分布, 发病率一般在 5% 左右, 严重可达 10%. 保山、大理、楚雄和曲靖的

收稿日期: 2006-09-11

作者简介: 李 凡(1970—), 男, 副教授, 博士, E-mail: fanlikm@126.com

基金项目: 云南省自然科学基金(2003C0042M)

陆良等地水稻条纹叶枯病的发病尤为普遍,已严重影响了当地的水稻生产,成为仅次于稻瘟病的水稻主要病害之一。RSV 是尚未确定科的归属的纤细病毒属 *Tenuivirus* 的代表种,是一类具有双义(ambisense)编码特征的负单链 RNA(-ssRNA)多分体病毒,由灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 以持久方式经卵传给后代,可侵染水稻、玉米、大麦、小麦等多种禾本科植物^[5]。RSV 基因组由 4 条 RNA 组成,编码 7 个 ORF(open reading frame)^[6-8]。其中 RNA4 毒义链(virus sense RNA, vRNA)编码 1 个相对分子质量为 20 500 的病害特异性蛋白(disease special protein, SP),该蛋白在病叶的积累量与病害症状的严重度存在密切的关系^[9]。本文应用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、基因克隆和序列测定分析等分子生物学技术,分析了云南水稻条纹叶枯病主要病区 RSV SP 基因的分子变异,并对纤细病毒属 6 种病毒之间的亲缘关系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

呈典型水稻条纹叶枯病症状的水稻病株,采自云南大理、陆良、禄劝、石林、玉溪、保山和宜良等地水稻种植田,在防虫条件下移植于花盆中栽培保存,并剪下少许病叶于 -20 ℃ 保存备用。

1.2 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶、TRIZOL® 试剂、M-MuLV 反转录酶、限制性内切酶等均为上海生工生物工程技术公司产品,QIAEX II Gel Extraction Kit 为 QIAGEN 公司产品,pMD18-T 克隆载体为 TaKaRa 公司产品,其余试剂为国产分析纯或化学纯。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中的 RSV SP 基因序列自行设计,由上海博亚生物技术有限公司合成。序列如下:SP5:5'-AGAATCGAAGATGCAAGACGTA-3'(对应于 RSV RNA4 的第 45~66 位核苷酸),SP3:5'-GGTG-GAAAATGTGATATGCAAT-3'(对应于 RSV RNA4 的第 595~616 位核苷酸)。

1.4 病叶总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

取冻存水稻病叶 50~100 mg,于液氮下迅速研磨成粉状,然后用 TRIZOL® 试剂提取病叶总 RNA,方法按公司提供的产品说明书进行。利用特异性引物 SP5/SP3 进行 RT-PCR,反转录按公司提供的产品说明书进行。PCR 扩增条件:94 ℃ 进行预变性

4 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 2 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环后,72 ℃ 保温 10 min。

1.5 基因克隆及序列测定

PCR 产物电泳后采用 QIAEX II Gel Extraction Kit 进行目的片段纯化,纯化产物连接至克隆载体 pMD18-T 并转化大肠杆菌 DH5 α ,对重组质粒进行双酶切和 PCR 双重鉴定后确定阳性重组子。选取阳性重组菌株,制成含 φ = 15% 甘油的新鲜菌液,寄往上海博亚生物技术有限公司,采用 ABI 3730 型 DNA 测序仪进行序列测定。通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>、<http://www.ebi.ac.uk/clustalw> 和 DNAMAN software (Lynnon BioSoft, 1994—1998)、DNASP 等网站和软件进行序列比较分析。

2 结果与分析

2.1 RSV 云南分离物 SP 基因 RT-PCR 扩增和序列比较分析

对 2003 年云南 7 个水稻条纹叶枯病感病样品提取病叶总 RNA,应用 SP5/SP3 引物对其进行扩增后,均可得到 1 条 550 bp 左右的 DNA 条带,与预期结果相符。对 PCR 产物进行分子克隆,并将不同分离物的阳性重组子进行了序列测定,获得云南大理、陆良、禄劝、石林、玉溪、保山、宜良 7 个水稻种植区 RSV 分离物(分别命名为 DLi03、LLi03、LQu03、SLi03、YXi03、BSh03 和 YLi03 分离物)的 SP 基因核苷酸序列(基因登录号分别为 AJ620307、AJ620309~AJ620312、AJ780915、AJ780916 和 AJ620308),大小均为 537 nts,共编码 178 个氨基酸。以江苏洪泽分离物 HZe03 和 2 个日本分离物 T、M 作为对照,对近几年报道的 RSV 云南分离物的 SP 基因进行序列同源性比较分析。结果发现,这些 RSV 分离物的核苷酸同源性为 93.5%~99.8%,推导的氨基酸同源性为 94.9%~100%(图 1)。依据核苷酸同源性构建的同源进化树,可以将这 27 个分离物划分为 3 个组,江苏洪泽 HZe03 分离物和 2 个日本 T、M 分离物以及少部分云南分离物 SLi03、YYL01、YCX01A 和 YCX01B 组成第 1 组;剩余的 20 个云南分离物又被划分为 2 个组。另外,云南 RSV 不同分离物的 SP 基因在同一地理来源及不同年际间都存在着一定的分子变异,如同样来自楚雄的 YCX01、YCX01A、YCX01B、YCX00、YCX02 和 YCX97 等分离物被分成 2 个组,不同 RSV 分离物的 SP 基因变异与其地理来源没有明显相关性;而同样于 2001 年采自楚雄的

YCX01、YCX01A 和 YCX01B 也被分成 2 个组,同一地区的 RSV 分离物的 SP 基因也存在一定的变异.

运用 DNASP 分析软件对 24 个 RSV 云南分离物的 SP 基因进行遗传多样性分析,结果表明,这些 RSV 分离物 SP 基因的遗传多样性值(nucleotide diversity)为 0.034 03,24 个 RSV 分离物 SP 基因核苷酸序列的总突变点有 601 个,突变多态位点(poly-morphic sites)共 121 个,其中转换(transition)位点为 13 个,颠换(transversion)位点为 97 个,核苷酸多态位点比例(proportion of nucleotide polymorphic site)为 18.7%. 氨基酸的总突变位点 36 个,多态位点 27 个,氨基酸多态位点比例(proportion of amino acid polymorphic site)为 15.2%,其有义突变率为 6.0%,绝大多数核苷酸突变为无义突变.

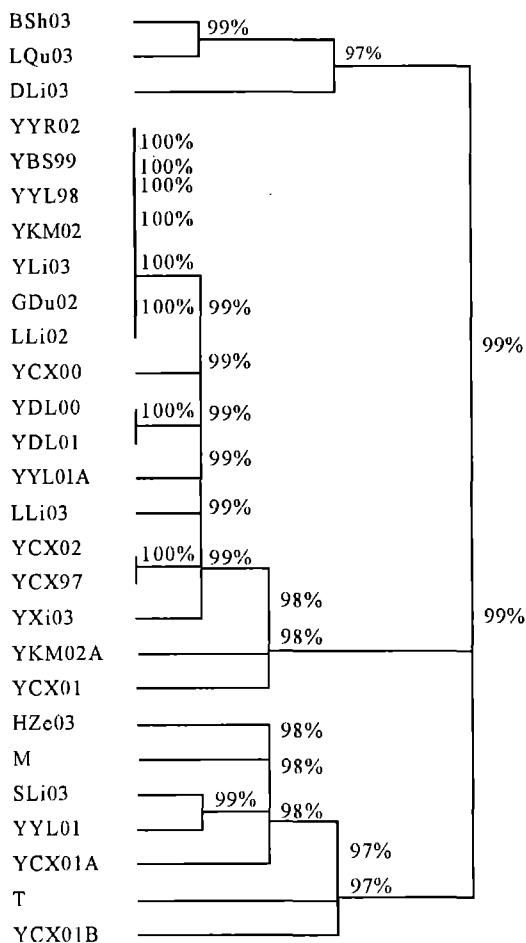


图1 根据 27 个 RSV 分离物 SP 基因核苷酸序列的同源性构建的同源树

Fig.1 Homology trees of RSV SP gene of 27 isoates based on nucleotide sequences identities

2.2 纤丝病毒属 6 种病毒的亲缘关系

根据 RSV SP 蛋白氨基酸序列比较结果,选取有代表性的 RSV 4 个分离物 BSh03、YCX01、YCX01A.

和 YKM02 与纤丝病毒属其他 5 个确定成员水稻白叶病毒(*Rice hoja blanca virus*, RHBV)、稗草白叶病毒(*Echinochloa hoja blanca virus*, EHBV)、水稻草矮病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV)、尾稗草白叶病毒(*Urochloa hoja blanca virus*, UHBV)和玉米条纹病毒(*Maize stripe virus*, MSStV)相应蛋白氨基酸序列进行系统进化分析比较,根据 SP 蛋白氨基酸序列同源性构建的同源树表明,RSV 与 MSStV 同源性最高,达 73%,与 RHBV、UHBV 和 EHBV 同源性为 60%,与 RGSV 同源性最小仅为 25%. 根据彼此 SP 蛋白氨基酸序列的遗传距离构建了系统进化树(图 2),分析结果与根据蛋白氨基酸序列同源性构建的同源树结果相同. 因此,纤丝病毒属 6 种病毒中,RSV 与 MSStV、RHBV、UHBV 和 EHBV 的亲缘关系最近,彼此之间的氨基酸同源性达 94% 以上,RGSV 与其他 5 种病毒的亲缘关系最远.

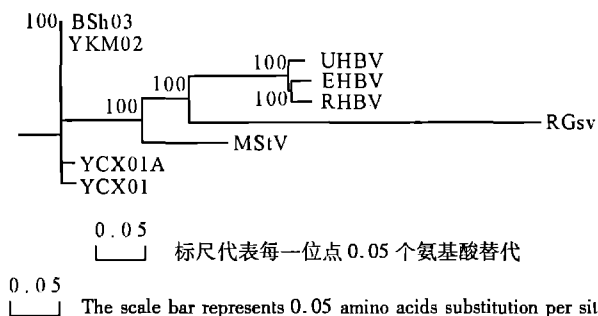


图2 根据 RSV SP 蛋白与纤丝病毒属其他病毒相应蛋白氨基酸序列遗传距离建立的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic trees based on the SP amino acids genetic distance identities in different viruses of *Tenuivirus*

3 讨论

RSV 基因组由 4 条 ssRNA 组成,编码 7 个蛋白,其他蛋白是否也存在广泛的变异,尚需进一步的研究. 现已研究表明 RSV RNA3 和 RNA4 的基因间隔区存在着更广泛的变异,以云南为代表的亚种群变异尤为复杂^[10],同时,RSV 不同分离物间存在着致病性的差异^[11]. 魏太云^[12]根据 RSV 的 SP、CP、NS2、NS3 遗传多样性分析结果,认为我国 RSV 存在以云南和云南以外病区为代表的 2 个亚种群,各分离物的变异及亲缘关系与其地理分布位置有一定的关系. 我们对云南不同分离物 RSV SP 基因进行的分析结果表明,云南 RSV 分离物的 SP 基因在同一地理来源及不同年际间都存在着一定的分子变异. 分析其原因可能是云南独特的生态环境所造成的,云南地处低纬度高海拔地带,具有“立体地形,立体气

候,立体植被”和“一山分四季,十里不同天”的特点。同时 RSV 具有广泛的寄主范围,可侵染多种禾本科植物,而且云南各稻区的水稻栽培品种较多,除各地选育的主栽品种外,还有很多当地的农家自繁品种。另外,RSV 可在其传播介体灰飞虱体内增殖,并经卵传给后代,这就进一步增加了灰飞虱传毒的时间和带毒介体的种群数量,使得 RSV 更容易分布到不同的生态环境中去。而且 RNA 病毒具有很大的群体数目、很高的复制速率和很短的世代的特点,造成 RNA 病毒群体具有极端高的遗传变异特征^[13]。这些因素的长期作用,极有利于 RSV 新株系的形成,从而使 RSV 与植物寄主及传播介体在漫长的协同进化中具有较高的遗传多样性。此外,云南独特的地理气候条件在 RSV 的传播过程中形成了相对的地理隔离,导致云南 RSV 比云南以外的 RSV 具有更复杂的分子变异。

但从 RSV SP 蛋白氨基酸序列的同源性分析来看,云南 RSV SP 基因在不同地理来源和不同年际间的变异较为稳定,24 个 RSV 云南分离物 SP 基因核苷酸绝大多数突变为无义突变。结合云南 24 个 RSV 分离物的 SP 基因核苷酸和氨基酸序列同源性比较分析,云南 RSV 分离物的 SP 基因的变异与其地理分布位置的关系并不十分明确。但基于全国范围,RSV SP 基因无论是核苷酸序列同源性还是氨基酸序列同源性在种群遗传结构上与其地理分布存在一定的相关性,云南以外 RSV 分离物在进化上较为保守,而云南 RSV 分离物可能由于相对的地理隔离,在云南复杂的地理气候条件下,负选择压力的直接作用中,相比较云南以外 RSV 表现在分子变异上的频率则较大。

云南独特的地理气候条件和丰富的生物多样性为 RSV 的变异提供了良好的条件,RSV 的分子变异是否与 RSV 的致病性分化具有相关性,这一部分工作需要深入研究,研究的可能结果可以为 RSV 蛋白的可能功能的推测提供依据,还可以为 RSV 基因组的转录、复制的研究以及抗病毒的基因工程等研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 林奇英,谢联辉,周仲驹,等. 水稻条纹叶枯病的研究: I. 病毒的分布和损失[J]. 福建农学院学报,1990,19(4):421-425.
- [2] 谢联辉,魏太云,林含新,等. 水稻条纹病毒的分子生物学[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2001,30(3):269-279.
- [3] 马学文,陈思宏,王兆伦. 洪泽县大面积发生水稻条纹叶枯病[J]. 植物保护,2001,27(4):52.
- [4] 杨荣明,刁春友,朱叶芹. 江苏省水稻条纹叶枯病上升原因及防治对策[J]. 植保技术与推广,2002,22(3):9-10.
- [5] TORIYAMA S. *Rice stripe virus* [M] // CMI/AAB. Descriptions of plant viruses. Scotland: CMI/AAB, 2000: 375.
- [6] TAKAHASHI M, TORIYAMA S, HAMAMATSU C, et al. Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of *Rice stripe virus* RNA segment 2 [J]. J Gen Virol, 1993,74(4):769-773.
- [7] ZHU Y, HAYAKAWA T, TORIYAMA S, et al. Complete nucleotide sequence of RNA3 of *Rice stripe virus*: An ambisense coding strategy [J]. J Gen Virol, 1991,72(4):763-767.
- [8] TORIYAMA S, TAKAHASHI M, SANO Y, et al. Nucleotide sequence of RNA1, the largest genomic segment of *Rice stripe virus*, the prototype of the tenuiviruses [J]. J Gen Virol, 1994,75(12):3569-3579.
- [9] 林奇田,林含新,吴祖建,等. 水稻条纹病毒外壳蛋白和病害特异蛋白在寄主体内的积累[J]. 福建农业大学学报,1998,27(3):322-326.
- [10] 魏太云,林含新,吴祖建,等. 水稻条纹病毒两个分离物 RNA4 基因间隔区的序列比较[J]. 中国病毒学,2000,15(2):156-162.
- [11] 林含新,魏太云,吴祖建,等. 我国水稻条纹病毒 7 个分离物的致病性和化学特性比较[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(2):164-167.
- [12] 魏太云. 水稻条纹病毒基因组结构与群体遗传结构分析[D]. 福州:福建农林大学植物保护学院,2003.
- [13] MOYA A. The evolution of RNA viruses: A population genetic view [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(13): 6967-6973.

【责任编辑 周志红】