

我国水稻条纹病毒一个强致病性分离物的 RNA4 序列测定与分析^{*}

林含新 魏太云 吴祖建 林奇英 谢联辉

(福建农业大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘 要 对我国水稻条纹病毒(Rice Stripe Virus, RSV)一个强致病性分离物(辽宁 PJ 分离物)的 RNA4 区段进行扩增、克隆和测序,其核苷酸序列全长 2157bp。与已报道的日本 T 和 M 分离物及我国云南 CX 分离物的 RNA4 序列进行比较分析,结果表明,这 4 个分离物可分为两组,其中 PJ、T 和 M 分离物为一组,组内分离物之间, RNA4 的毒义链(vRNA4)及 RNA4 的毒义互补链(vcRNA4)上的 ORF 的核苷酸一致性分别为 97.0%和 97.0%~97.5%, 5'末端和 3'末端非编码区的序列则完全一致。但 PJ 分离物与 T 分离物的亲缘关系更为密切,其基因间隔区(IR)与 T 分离物的等长,核苷酸一致性为 93.0%,比 M 分离物的 IR 多了一段长 19bp 的插入序列,核苷酸一致性仅为 85.0%。另一组为我国 CX 分离物,组与组之间, vRNA4 及 vcRNA4 上的 ORF 的核苷酸一致性分别为 94.0%和 92.5%~93.5%,但在氨基酸水平上则没有明显的差异。CX 分离物的 IR 与 PJ 分离物相比有一段长 84bp 的插入序列,组间 IR 的核苷酸一致性仅为 72.0%~75.0%, 5'末端非编码区的序列完全一致,但 3'末端非编码区有两个碱基的差异。这些结果表明,RSV 在自然界的分子变异与其地理分布具有密切的关系。此外,非编码区序列的高度保守性暗示着它们在病毒基因转录和复制的调控方面具有重要的功能。本文还讨论了 RSV 的分子流行病学。

关键词: 水稻条纹病毒, 序列分析, 亲缘关系

中图分类号: S432.41 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0025-06

水稻条纹病毒(Rice Stripe Virus, RSV)引起的水稻条纹叶枯病是水稻的一种重要病毒病。该病广泛分布于我国十六个省市,曾造成严重的损失,至今仍在云南等地猖獗危害^[1]。

RSV RNA2、3、4 区段都是采取双义(ambisense)编码策略^[2~6],在 RNA4 的毒义链(viral-sense strand)上的 ORF 可编码一种在病叶中大量积累的危害特异性蛋白(SP, S 蛋白, NS4 或 NCP),该蛋白在病叶中的积累量与症状的发展关系密切^[7,8]。RNA4 的毒义互补链(viral-complementary strand)上的 ORF 编码一个未知功能的蛋白(NSvc4)。RNA4 基因间隔区(intergenic region, IR)内存在 U 和 A 碱基富集带及可能的发夹结构,IR 的发夹结构可能具有终止 mRNA 转录及保持 ssRNA 稳定性的作用^[4]。

我们对来自云南宜良(YL)、云南保山(BS)、福建龙岩(LY)、上海嘉定(JD)、辽宁盘锦

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39670489)和福建省自然科学基金资助项目(C97031)

作者简介:林含新(1971-)男,福建莆田人,福建农业大学植保系助理研究员,博士,主要从事植物病毒学研究。

RSV PJ 分离物 RNA4 全长序列已送 GenBank 登记,注册号为:AF233397

收稿日期:2000-04-11,修回日期:2000-09-15

(PJ)、北京双桥农场(SQ)以及山东济宁(JN)等7地所分离到的RSV分离物进行了研究,初步发现这些分离物之间存在致病性分化及分子变异,其中SQ和PJ分离物致病性最强(待发表资料)。因此,我们测定了PJ分离物的RNA4序列,以探讨RSV的分子演化及基因功能。

1 材料和方法

1 RSV 分离物

采自辽宁盘锦田间的病株经昆虫接种分离纯化后,保存于合系28水稻品种上。

1.2 引物

根据日本M分离物RNA4序列^[6],设计了三对引物,分段扩增RNA4,引物由中国科学院上海植物生理研究所、上海基康生物技术有限公司合成,序列如下:

- Ter 5'ACACAAAGTCCT(A)GGG3'(与1~15nt一致)
- S2 5'GGTGGAAAATGTGATATGCAAT3'(与597~616nt互补)
- IR41 5'CCAACCTCTTCTACACAAGAC3'(与567~587nt一致)
- IR42 5'GTAGGTGAGATAACCAGTTCC3'(与1208~1228nt互补)
- W41 5'TCTCACCTACATGATGACAG3'(与1221~1240nt一致)
- NW42 5'ACACAAAGTCATGGCATATC3'(与2118~2137nt互补)

1.3 病毒提纯

参照Ishikawa等^[6]的方法,略作修改。

1.4 病毒 RNA 的提取

根据Toriyama等^[7]的方法,略作改进。提纯的病毒经SDS、蛋白酶K处理,酚-氯仿抽提后得到病毒RNA,经紫外测定, $OD_{260/280}$ 约为1.8~2.0。

1.5 RT-PCR

1.0μg病毒RNA模板和10 pmol的3'端引物先在95℃处理10 min,再按Promega公司的cDNA合成试剂盒说明书进行cDNA第一条链的合成。PCR扩增是在50μL反应体系中进行,包括反转录产物2μL,5'端和3'端引物(10 pmol/μL)各5μL, dNTP(每份10 mmol/L)1μL, 10×buffer 5μL, DDW 28μL, MgCl₂(25mmol/L)3μL, Taq DNA聚合酶(4U/μL, MBI公司产品)1μL。采用双退火温度进行扩增,5'端区和3'端区的扩增条件是,前5个循环,94℃变性1 min、50℃退火2 min、72℃延伸2 min;后25个循环,除退火温度改为52℃外,其余同前,最后一个循环结束后,72℃保温10 min。而IR的双退火温度为前5个循环30℃,后25个循环37℃,其余条件一致。

1.6 克隆及测序

RT-PCR扩增产物经纯化后,直接连接于pGEM-T easy载体(Promega公司产品)克隆位点,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,筛选阳性克隆。DNA测序由上海基康生物技术有限公司进行。

1.7 序列分析

用DNASIS及PROSIS软件(Hi-ochi Software Engineering Co., Ltd.)进行序列分析。

2 结果

2.1 克隆及测序

应用三对引物分段扩增 PJ 分离物的 RNA4 ,得到的三个片段中 NS4 长约 620bp , RNA4 IR 长约 680bp ,NSvc4 长约 920bp(图 1) ,由此得到的 RNA4 全长共 2157bp。

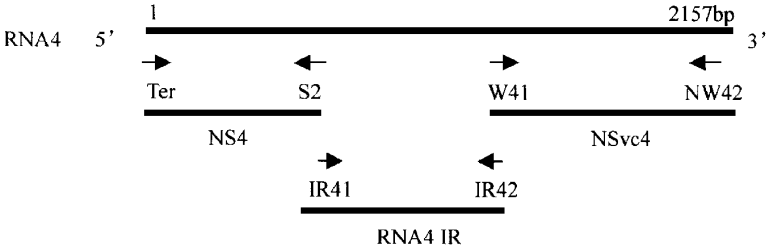


图 1 覆盖 RSV-RNA4 全长的 RT-PCR 克隆策略

Fig. 1 Cloning strategy to cover the complete sequence of RSV-RNA4 by RT-PCR

2.2 序列分析

表 1 表明 , 尽管 PJ 分离物与 CX 分离物均来自中国 , 但其核苷酸序列差异较大 , vRNA4 ORF、RNA4 IR 和 vcRNA4 ORF 的核苷酸一致性明显低于 PJ 分离物与日本两个分离物的核苷酸序列一致性 , 可见 PJ 分离物与日本分离物具有更近的亲缘关系 , 据此可将这四个分离物分为两个组 , CX 为第一组 , 其它三个分离物为第二组。第二组内各分离物之间的 vRNA4 ORF 和 vcRNA4 ORF 的核苷酸一致性分别为 97.0% 和 97.0% ~ 97.5%。其中 , PJ 分离物与 T 分离物的亲缘关系又比与 M 分离物更近 , 特别是易发生变异的 IR 序列内 , PJ 分离物的 IR 与 T 分离物一样长 , 核苷酸序列一致性为 93.0% , 而 PJ 分离物的 IR 比 M 分离物的多一段 19bp 的插入序列 , 其核苷酸序列一致性仅为 85.0%。在 5' 末端和 3' 末端非编码区序列内 , 该组的三个分离物完全一致。CX 分离物的 5' 末端非编码区序列也与其他三个分离物一致 , 但在 3' 末端非编码区内有两个碱基差异 , 一致性为 96%。CX 分离物与另一组的 RNA4 ORF 和 vcRNA4 ORF 的核苷酸一致性分别为 94.0% 和 92.5% ~ 93.5% , 但在氨基酸水平上无明显的差异。CX 分离物的 IR 与 PJ 分离物相比有一段长 84bp 的插入序列 , 组间 , IR 的核苷酸一致性仅为 72.0% ~ 75.0%。

表 1 我国 RSV-PJ 分离物与已报道的 T、M、CX 分离物
vRNA4 ORF、RNA4 IR 和 vcRNA4 ORF 序列一致性比较

Table 1 Comparison of sequences identities of vRNA4 ORF , RNA4 IR and vcRNA4 ORF
of RSV among PJ isolate and previously reported T , M and CX isolates

Nucleotide acid sequence level												
vRNA4 ORF				RNA4 IR				vcRNA4 ORF				
	PJ	CX	M	T	PJ	CX	M	T	PJ	CX	M	T
PJ		94.0	97.0	97.0		75.0	85.0	93.0		92.5	97.0	97.5
CX	98.0		94.0	94.0			72.0	74.0	98.0		93.5	93.5
M	98.0	97.0		97.0				87.0	98.0	97.0		97.5
T	99.0	98.0	98.0						98.0	97.0	98.0	

Amino acid sequence level

RNA 二级结构预测分析发现 ,PJ 分离物 RNA4 IR 和 CX、T 及 M 分离物一样 ,在 AU 碱基富集处可形成两个明显的发夹结构 ,其中 T 分离物在第 917~922nt、PJ 分离物在第 935~955nt、CX 分离物在第 991~1025nt、M 分离物在第 904~925nt 处可形成发夹结构。PJ、CX、M 和 T 分离物在这一区段序列所形成的发夹结构的最低自由能 (ΔG) 分别为 -18.9kj、-0.42kj、-7.14kj 和 -36kj ,很明显 ,这一区段序列所形成的发夹结构中 ,T 分离物最为稳定、CX 分离物最不稳定。PJ 分离物和 T 分离物在第 1011~1054nt ,M 分离物在第 991~1052nt 可形成另一发夹结构 ,其最低自由能 (ΔG) 为 -160kj。

编码区内发生的大部分碱基变异都是无义的 ,如 T 分离物的 RNA4 ORF 与 PJ 分离物相比有 11 个碱基变异 ,但仅在 463 位上由于 C 变成 A 而导致 NS4 氨基酸序列上的 Leu 变为 Me(图 2) ,然而根据蛋白质二级结构预测结果 ,该变异并不导致 NS4 二级结构的变化。但在 NSvc4 蛋白序列中所发生的一些氨基酸替代则导致了该蛋白二级结构的变化 ,如与 PJ 分离物相比 ,T 分离物在第 10 位(ser→Leu) ,M 分离物在第 87 位(Lys→Arg) ,CX 分离物在第 212 位(Arg→Ser)上氨基酸的变异(图 3)。

PJ 1	MQDVQRTIEV	SVGPIVGLDY	TLLYDTLPET	VSDNITLPDL	KDPERVTEDT	KKLILKGCVV
T	-----V--	-----	-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PJ 61	IAYHHPLETD	TLFIKVHKHI	PEFCHSFLSH	LLGGEDDDNA	LIDIGLFFNM	LQPSLGGWIT
T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	T-----	-----	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----	-----I	-----
PJ 121	KNFLRHPNRM	SKDQIKLLLD	QIKMAKAES	SDTEEYEKVV	KKMPTYFESI	IQPLLHKT
T	-----	-----M--	-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CX	-----	-----M--	-----	-----	-----	-----

图2 RSV-PJ 与 T、M 及 CX 分离物 NS4 氨基酸序列比较

Fig. 2 Multialignment of amino acid sequence of NS4 among PJ and T , M , CX isolates

PJ 1	MALSRLSTS	KSKVLYDDL	EESQKRVDNK	NRKSIALSRR	PLNQGRVRID	QAATMLGLEP
T	-----L	-----	-----	-----K-	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----K-	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----K-	-----	-----
PJ 61	FSFSDVKVVK	YDMFIKQDY	SVKAHRKATF	NILVDPYWFFH	QPLTHYPFFR	VATFAMVWIG
T	-----	-----	-----	-----	-----	-----E-
M	-----	-----	-----R	-----	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----	-----	-----L-
PJ 121	IKGRASGITT	LRIIDKSYVN	PSDQVEVEVR	YPISKNFAVL	GSLANFLALE	DKHNLQVSVS
T	-----	-----	S-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CX	-----V--	-----	-----	-----	-----	-----
PJ 181	VDDSSVQNCV	ISRTLWFWGI	ERTDLPVSMK	TNDTVMFEFE	PLEDKAINHL	SSFSNFTTNV
T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----S--L-	-----	-----
PJ 241	VQKAVGGAFT	SKSFPELDT	KEFGVVKQPK	KIPITKKSKS	EVSVM	-----
T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CX	-----	-----	-----	-----	-----	-----

图3 RSV-PJ 与 T、M 及 CX 分离物 NSvc4 氨基酸序列比较

Fig. 3 Multialignment of amino acid sequence of NSvc4 among PJ and T , M , CX isolates

3 讨论

对 4 个分离物 RNA4 序列分析的结果发现,序列变异十分不均衡,5'和 3'末端非编码区的序列十分保守,而基因间隔区则易于突变。末端序列的高度保守性表现它们在病毒 RNA 的转录、复制及蛋白的转译方面具有重要的功能^[10]。3'末端 15 个碱基是 RNA 聚合酶的识别位点,充当了启动子的作用^[11],该段序列在 4 个分离物中也完全一致。IR 序列内,PJ 和 T 分离物有一段插入序列,CX 的插入序列更长。IR 的发夹结构被认为具有终止 mRNA 转录及保持 ssRNA 稳定性的作用^[4]。在上文的序列分析中,我们发现,尽管各个分离物都有二级结构,但其稳定性相差较大,T 分离物最为稳定,CX 分离物最不稳定,那么,这种稳定性和插入片段的差异是否与它们的生物学性状有关呢?另外,各分离物在 NS4 蛋白序列内所发生的氨基酸变异都没有改变蛋白的二级结构,而 NSv4 蛋白序列内发生的氨基酸变异则改变了二级结构,这种改变是否会导致生物学性状的相应变化尚待研究。

序列一致性比较结果表明,我国辽宁 PJ 分离物与日本分离物具有较近的亲缘关系,特别是与 T 分离物关系更近,而与云南 CX 分离物关系较远。那么,是否 PJ 分离物即为日本 T 分离物通过昆虫传播而来呢?这是很有可能的。从流行为害的地点和时间上看,我国最早是 1963 年在江、浙、沪一带发生,1966 年大流行,而后扩展到南北方大稻区。1975~1976 年在北京郊区,1979~1980 年在云南姚安、易门等在大爆发。80 年代后,又在山东、云南和辽宁等地大面积流行^[12,13,41]。在日本,早在本世纪初,水稻条纹叶枯病即在关中、关东地区普遍流行^[15]。因此,RSV 最可能起源与日本的关中和关东地区。至于 RSV 如何从日本传到中国,这可能与亚洲的季风气候特点有关。我国东部和日本都属于温带季风气候和亚热带季风气候,夏季盛行东南风,冬季盛和西北季风。人们对水稻灰飞虱是否具有远距迁飞能力尚不确定,但 Kisimoto 的报道^[16]中曾提到在我国东海上捕捉到为数不少的灰飞虱,说明灰飞虱可以借助地季风的作用进行远距离迁飞。因此,其可能的传播途径是带毒灰飞虱被冬季西北季风从日本带到我国江、浙、沪一带,然后向北逐渐扩散到山东、北京和辽宁,向南扩展以福建。当然,不能排除后来某些中国分离物又在夏季的东南风作用下传播到日本的可能性。从我们对采自福建、上海、山东、北京及云南保山、宜良的分离物 SP 基因和 CP 基因的序列分析看,沿海地区,如福建、上海、山东、北京及辽宁分离物亲缘关系较近,与日本 T 和 M 分离物的关系也比较近,而与云南两个分离物相差较远。

参 考 文 献

- [1] 林含新,林奇英,谢联辉. 中国病毒学,1997,1X(3):203~209.
- [2] Takahashi M, Toriyama S, hamamatsu C, et al. J Gen Virol, 1993, 74:769~773.
- [3] Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. J Gen Virol, 1991, 72:763~767.
- [4] Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. J Gen Virol, 1992, 73:1309~1312.
- [5] Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, et al. J Gen Virol, 1990, 7X(2):1427~1432.
- [6] Kakutani T, Hayano T, Minobe Y. J Gen Virol, 1991, 7X(2):465~468.
- [7] Toriyama S. Microbil Sci, 1986, 3:347~350. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [8] 林奇田 林含新 吴祖建, 等. 福建农业大学学报, 1998, 27(3): 322~326.
- [9] 曲志才 沈大棣 邓可京, 等. 微生物学报, 1999, 39(1): 36~42.
- [10] Ramirez B C, Haenni A L. *J Gen Virol*, 1994, 75: 467~475.
- [11] Barbier P, Takahashi M, Nakamura I, et al. *J Gen Virol*, 1992, 66: 6171~6174.
- [12] 谢联辉 林奇英. 中国农业科学, 1984, 6: 58~65.
- [13] 刘玉彬. 云南农业科技, 1989, 3: 10~13.
- [14] 林奇英, 谢联辉, 周仲驹, 等. 福建农学院学报, 1990, 19(4): 421~425.
- [15] Kisimoto R, Yamada Y, Okada M, et al. *Plant Protection*(Japan), 1985, 39(11): 531~537.
- [16] Kisimoto R. *Ecol Entomol*, 1976, 1: 95.

SEQUENCE ANALYSIS OF RNA4 OF A SEVERE ISOLATE OF RICE STRIPE VIRUS IN CHINA *

Lin Hanxin Wei Taiyun Wu Zujian Lin Qiyong Xie Lianhui

(Institute of Plant Virology of Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: RNA4 segment of a severe isolate of Rice stripe virus, isolated from Liaoning province and designated as PJ isolate, was amplified, cloned and sequenced. RNA4 of PJ isolate had 2157 nucleotide in length. When compared with RNA4 of T and M isolates of Japan and CX isolate of Yunnan province of China that had been previously reported, we found that these four isolates could be divided into two groups. PJ, T and M isolates shared 97.0% and 97.0%~97.5% identities in vORF4 and vcORF4 at the nucleotide level, respectively and formed one group. The sequences in 5' and 3' terminal non-encoding region were completely identical among these three isolates. In this group, PJ isolate was more closely related to T isolate than to M isolate. The length of intergenic region(IR4) of PJ isolate was as same as that of T isolate, and had 93.0% sequence identity. However, PJ IR4 had an insertion of 19bp in length compared with isolate M and had only 85.0% sequence identity. CX isolate belonged to another group, which shared only 94.0% and 92.5%~93.5% sequences identities in vORF4 and vcORF4 at the nucleotide level, respectively, even though there were not significant difference between these two group at the amino acid level. There was an insertion of 84bp in length in the IR4 of CX isolate compared with PJ isolate and the sequence identity between two group reached to 72.0%~75.0%. Even though no base variation occurred in 5' terminal non-coding region, there was two bases substitution in 3' terminal non-coding region. These results showed that the isolates were grouped according to their geographical location. Additionally, highly consensus in 5' and 3' non-encoding region suggested that these regions played an very important role in transcription and replication of viral genome. Finally, the molecular epidemiology and gene functions of Rice stripe virus were discussed in this paper.

Key words: Rice stripe virus, Sequences analysis, Evolutionary relationship