

水稻条纹病毒 RNA4 基因间隔区序列分析 ——混合侵染及基因组变异证据

魏太云 林含新 吴祖建 林奇英 谢联辉*

(福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘要 克隆和测定了我国水稻条纹病毒(RSV) 22 个分离物 RNA4 基因间隔区(Intergenic region IR)序列,序列比较结果表明,我国 RSV RNA4 IR 在长度上存在 634bp、654bp 及 732bp 3 种不同的类型,其中 3 种不同类型的序列在云南省均有存在,而在其它省份仅存在 654bp 类型的序列,云南省还存在不同片段类型序列在同一分离物中混合侵染的现象。序列内部具有两个重要的结构特征,一是具有插入序列;二是有两处反向重复序列,可形成两个明显的发夹结构,其中一个序列比较保守,形成的发夹结构稳定,但另一个发夹结构由于碱基变异导致其稳定性在各个分离物中差异较大。本论文还讨论了插入片段特性、不稳定的发夹结构的形成最低自由能及病毒致病性分化的关系。

关键词 水稻条纹病毒, RNA4 基因间隔区, 发夹结构

中图分类号 S432.41 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2003)05-0577-09

由水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)引起的水稻条纹叶枯病是当前我国水稻上的一种分布广、危害大的重要病毒病,分布于我国 16 个省市^[1]。1997~2002 年的实地调查表明,该病目前在江苏、河南、山东、云南、北京、辽宁、河北等省市的一些地区仍发生十分普遍^[2]。

RSV 是纤丝病毒属(Tenuivirus)的代表成员,由介体灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)以持久性方式经卵传播^[3]。RSV 具有独特的基因组结构和表达策略,是研究植物病毒与寄主和介体互作及协同进化机制的模式对象。日本 T 分离物的全序列已测定,基因组全长为 17145bp,由 4 种单链 RNA 组成,除 RNA1 采用负链编码外, RNA2~RNA4 皆采用双义(Ambisense)编码策略^[3]。其中, RNA4 的毒义链(Viral-sense strand)上的 ORF 编码 20.5 kD 的病害特异性蛋白(Disease specific protein, SP),与病毒的致病性相关^[4,5];毒义互补链(Viral-complementary strand)上的 ORF 编码 32.4 kD 的 NSvc4 蛋白,可能参与了病毒的胞间运动^[6]。两个 ORF 间是一段非编码的基因间隔区(Intergenic region, IR),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^[7-9],且还有可能在病毒复制和转录的转换过程中起到调控作用^[10]。

RSV 及其介体的广泛分布以及广泛的寄主范围极可能导致其丰富的遗传多样性。本研究对有代表性的病害常发区云南、辽宁、北京和山东,病害偶发区福建、上海以及病害暴

基金项目 国家自然科学基金(3000002, 30240017);高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200150)

* 通讯作者。Tel 86-591-3769714; Fax 86-591-3769704; E-mail: xielh@fjau.edu.cn

作者简介 魏太云(1975-)男,福建福清人,博士,主要从事水稻病毒分子生物学研究。E-mail: weitaiyun@yahoo.com.cn

收稿日期 2002-12-27, 修回日期 2003-07-04

发区江苏、河南等地分离的病毒分离物的 RNA4 IR 片段序列进行系统分析,以期为进一步研究病毒的演化规律及其可能调控策略打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒分离物

分别采集了福建龙岩,云南昆明、大理、保山、楚雄、江川、宜良、富民,上海嘉定,江苏洪泽与淮安,山东济宁,河南原阳与开封,北京双桥和黑庄户,辽宁盘锦与大洼等地有代表性的 RSV 病株,经 ELISA 检测为阳性结果后将病叶保存在 -80°C 冰箱中。另一部分病株经无毒昆虫饲毒接种分离纯化后,依病株产地分别得到 22 个分离物,保存于粳稻品种台系 28、台农 67 上(表 1)。

表 1 本研究 RSV 分离物来源

Table 1 Sources of RSV isolates used in the study

Isolate	Geographical origin	Year of isolation	Rice varieties
HZ	Hongze Jiangsu	2001	81692
HA	Huaian Jiangsu	2001	Wuyujing 3
BS	Baoshan Yunnan	1998	Jingguo 92
CX1	Chuxiong Yunnan	2000	Chujing 3
CX2	Chuxiong Yunnan	2001	Hexi 28
DL	Dali Yunnan	2001	Dianxi 4
YX	Yuxi Yunnan	2001	Hexi serial
JC	Jiangchuan Yunnan	2001	Hexi serial
YL	Yiliang Yunnan	2001	Hexi serial
HM	Huming Yunnan	2001	Hexi 2-44
KM1	Kunming Yunnan	2002	Hexi 2-44
KM2	Kunming Yunan	2000	Hexi 2-22
PJ1	Panjing Liaoning	1998	liaojing 5
DW	Dawa Liaoning	2001	Panjing 5
PJ2	Panjing Liaoning	2001	Panjing 1
BJ1	Beijing	1998	Fuyue
BJ2	Beijing	2001	Qiuguang
JN	Jining Shandong	2001	Zaofeng 9
JD	Jiading Shanghai	2001	98110
LY	Longyan Fujian	2001	Fuyou158
KF	Kaifeng Henan	2002	Yuanyou 6
YY	Yuanyang Henan	2002	90247

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP、核酸标准分子量(λ DNA/ *Eco*R I + *Hind* III) M-MuI.V 反转录

酶、RNasin RNA 提取试剂盒等均购自上海生工生物工程技术服务有限公司;QIAEX II Gel Extraction Kit 为 QIAGEN 公司产品。其余试剂为国产分析纯或化学纯。

1.3 病叶总 RNA 提取

病叶总 RNA 提取方法参照产品说明。

1.4 RT-PCR

根据 Kakutani 等^[8]报道的 RSV M 分离物 RNA4 的基因序列,设计一对用于扩增 RNA4 IR 的寡聚核苷酸引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,序列如下:P1:5' CCAACCTCTTCTACACAAGAC 3'(与 RNA4 5'端 567 ~ 587 bp 相对应);P2:5' GTAGGT-GAGATAACCAGTTCC 3'(与 RNA4 5'端 1208 ~ 1228 bp 互补)。反转录程序如下:取总 RNA 5 μ L, 3'端引物 1 μ L (10 pmol/L), ddH₂O 4 μ L, 95 $^{\circ}$ C 下变性 10 min, 冰上 5 min, 再依次加入下列试剂:5 \times M-MuLV 反转录酶缓冲液 5 μ L, dNTP 1 μ L (10 mmol/L), RNasin (40U/ μ L) 1 μ L, M-MuLV 反转录酶 (20U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 扩增是在 25 μ L 反应体系中进行,包括 2 μ L 反转录产物,各 2.5 μ L (10 pmol/L) 的 5' 端和 3' 端引物、0.5 μ L dNTP (10 mmol/L), 2.5 μ L 10 \times 缓冲液、13 μ L ddH₂O, 1.5 μ L (25 mmol/L) MgCl₂, 0.5 μ L (4U/ μ L) Taq DNA 聚合酶。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 37 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 测序和序列分析

采用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) 进行目的片段纯化,纯化产物直接测序。DNA 测序由上海基康生物技术有限公司进行。http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast、RNA draw (Hitachi, 1990) 和 DNAMAN (Lynnon BioSoft, 1994 ~ 1998) 等软件进行序列分析。

2 结果

2.1 各分离物同源性比较

分析结果表明,我国 RSV RNA4 IR 序列长度有 654 bp、634 bp 及 732 bp 3 种类型,其中长度为 634 bp、732 bp 的类型仅在云南 RSV 分离物中发现。结合已报道的 RSV 云南 Y^[11]、日本 T 和 M 分离物^[7,8] RNA4 IR 序列,25 个 RSV RNA4 IR 序列同源率在 83% ~ 100% 之间(表 2)。其中,上海 JD 与江苏 HZ 分离物序列一致,河南 YY 与 KF 分离物序列一致,其它分离物间的序列各不相同。云南 4 个 732 bp 类型分离物间的同源率在 95% ~ 98% 之间,与其它两种类型分离物间均仅有 83% ~ 85% 的同源率;云南 6 个 634 bp 类型分离物间的同源率在 95% ~ 98% 之间,与 13 个 654 bp 类型分离物之间的同源率在 89% ~ 93% 之间;654 bp 类型分离物在各个省份均有分布,其同源率在 90% ~ 100% 之间,其中北京 BJ1、辽宁 PJ2 与福建 LY 3 个分离物间的同源率均为 99%。辽宁 PJ1、北京 BJ2 两个分离物间同源率为 95%。病害暴发区中的江苏、河南 4 个分离物间的同源率均为 95%,其余各分离物间的同源率都在 95% 以下,特别是北京 3 个分离物间、辽宁两个分离物间的同源率均仅为 90%(表 2)。3 种不同类型的分离物在云南省共存的现象表明了云南 RSV 自然种群遗传多样性较为复杂,变异程度较高。另外,云南部分地区 RSV 还存在不同类型片段在同一分离物共存的现象,其中,多数是 634 bp 和 654 bp 两种类型在同一分离物中共存,少数是 634 bp 和 732 bp 两种类型以及 654 bp 和 732 bp 两种类型在同一分离物中共

存,没有 3 种不同类型片段在同一分离物中出现的现象。这些结果暗示云南 RSV 分离物还存在复合侵染 (Mixed infections) 现象。

表 2 RSV 各分离物 RNA4 IR 核苷酸序列同源性(%)

Table 2 Percentage nucleotides sequence identity of RNA4 IR among 23 RSV isolates(%)

	654 bp												634 bp						732 bp				
	BJ1	BJ2	PJ1	DW	PJ2	JN	YY	HA	HZ	LY	BS	YX	T	CX1	CX2	DL	HM	KM1	M	YL	JC	KM2	Y
BJ1	100	93	94	91	99	91	90	90	99	99	92	92	92	90	91	89	90	89	89	83	83	84	84
BJ2		95	92	93	93	92	91	92	94	93	94	94	91	92	90	91	91	91	91	84	84	85	85
PJ1			91	94	92	90	90	91	94	93	94	94	90	91	90	91	91	90	90	84	84	84	85
DW				91	93	95	91	95	91	91	92	91	90	91	90	90	91	89	85	85	86	85	85
PJ2					91	90	90	90	99	92	92	92	90	91	89	90	89	89	89	83	83	84	84
JN						92	91	93	92	91	92	92	91	92	91	91	91	91	91	85	84	84	85
YY							91	95	90	92	92	90	90	91	90	91	90	89	85	85	85	85	85
HA								91	90	90	91	90	93	94	92	93	93	92	83	83	83	84	84
HZ									91	91	92	91	90	92	91	91	91	90	84	84	85	85	85
LY										92	93	93	90	91	89	90	90	90	83	83	84	84	84
BS											98	93	91	91	90	90	90	90	83	83	83	83	83
YX												94	91	92	91	91	91	91	83	83	84	84	84
T													90	91	89	90	90	90	84	84	85	85	85
CX1														96	96	98	95	95	84	84	84	84	85
CX2															97	96	96	96	84	84	85	85	85
DL																96	95	95	84	84	84	85	85
HM																	95	95	84	85	85	85	85
KM1																		95	84	84	84	84	85
M																			83	83	84	84	85
YL																				98	95	95	95
JC																					96	96	96
KM2																							98
Y																							100

2.2 RSV RNA4 IR 结构特征分析

IR 序列内部具有两个重要的结构特征,其一是具有插入序列,相对于 6 个 634 bp 类型分离物,13 个 654 bp 类型分离物都有一段长 19 nt 的插入序列,这段插入序列比较保守,各分离物之间仅有 1~2 个碱基的差异(图 1)。732 bp 在这段区域内的插入序列长达 103 nt,这段插入序列高度保守,4 个分离物仅 Y 分离物有一个碱基的差异。Blast 分析结果表明,这些插入序列和已有的病毒序列并没有任何相似性,但是 19 nt 插入片段中第 4~19 个碱基(5'-AGAAACATGAGAGTA-3')与小麦 cDNA 文库中的一段序列(GenBank 登录号为 BE416147)基本上是一致的,103 nt 的插入片段中第 29~48 nt 序列(5'-AGAATTGCCTT-GGTGTAT-3')与大麦 cDNA 文库中的一段序列(GenBank 登录号为 BE420676)是一致的(图 1)。

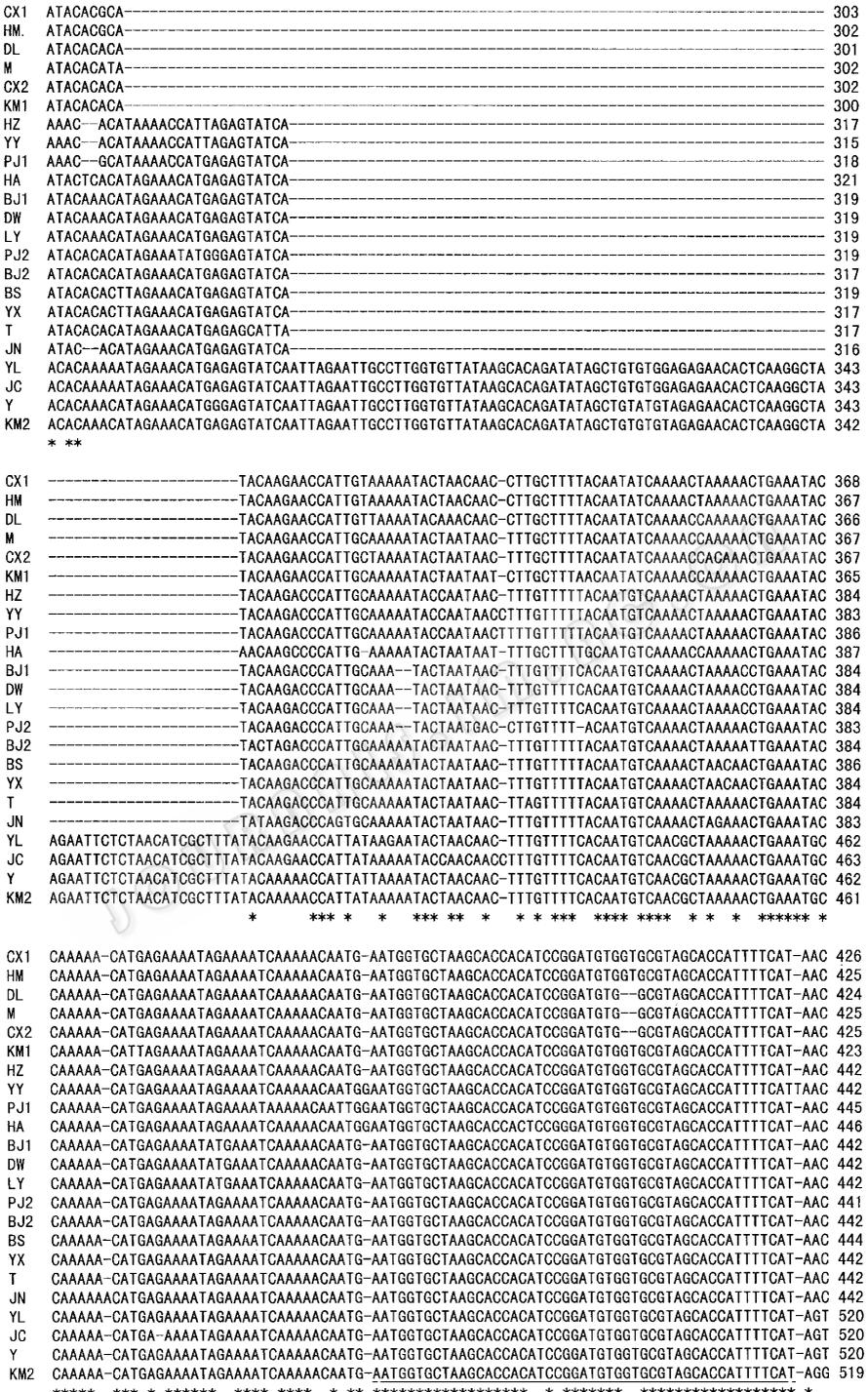


图 1 23 个 RSV 分离物 RNA4 IR 部分序列的多重序列比较

Fig. 1 Alignment of partial nucleotide sequences of RNA4 intergenic region of 23 isolates of RSV

* : Same nucleotide; - : Missed nucleotide; Single underlines indicate the nucleotide positions of predicted stable hairpin structure.

其二是具有发夹结构特征,IR 序列内含有几个 U 和 A 碱基富集区,其中有两处是反向重复序列。RNA 二级结构预测表明,这两处重复序列都能形成发夹结构。序列分析结果表明,各分离物在图 1 中划线处有一段长 49 nt 的片段序列高度保守,除 HA 分离物有 3 个碱基差异、3 个 634 bp 类型分离物有两个碱基缺失外,各分离物在这段的序列完全一致,且能形成最低自由能(ΔG)相对较低的发夹结构,其中 HA 分离物发夹结构的 ΔG 为 -102.1 kJ ,有两个碱基缺失的 3 个 634 bp 类型分离物发夹结构 ΔG 为 -122.2 kJ ,其它分离物形成发夹结构的 ΔG 均为 -132.3 kJ (图 2)。因此,微小的变异总体上并没改变各分离物在这段序列所形成的发夹结构的稳定性。

另外,23 个分离物都能在插入序列后 60 个碱基范围内形成一个稳定性各不相同的发夹结构,其中 732 bp 类型的云南 JC 分离物形成发夹结构 ΔG 最高,为 -1.3 kJ ,日本 T 分离物形成发夹结构 ΔG 最低,为 -25.6 kJ 。一般而言,发夹结构 ΔG 越低其稳定性越高。这表明 T 分离物在这一区段形成的发夹结构最稳定,而 732 bp 类型的 JC 分离物形成的发夹结构最不稳定;进一步分析表明,4 个 732 bp 类型分离物形成的发夹结构 ΔG 一般都较高,平均为 -3.4 kJ ,暗示这 4 个分离物在这一区段形成的发夹结构很不稳定;6 个 634 bp 类型分离物发夹结构 ΔG 平均为 -10.1 kJ ,最高为云南 CX1 分离物,为 -1.7 kJ ,最低为云南 HM 分离物,为 -18.1 kJ ;13 个 654 bp 类型分离物发夹结构的 ΔG 平均为 -19.3 kJ ,最高为 -8.4 kJ (福建 LY、山东 JN 分离物),最高为 -25.2 kJ (日本 T 分离物),其中有 9 个分离物发夹结构 ΔG 为 -23.9 kJ 左右,有 4 个分离物发夹结构 ΔG 在 -10.5 kJ 左右,表明这 13 个分离物在这一区段所形成的发夹结构的稳定性相对较高。

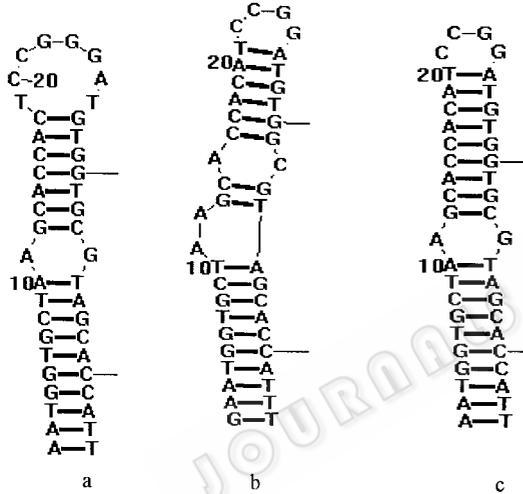


图 2 RNA4 基因间隔区 3 个预测的稳定的发夹结构

Fig. 2 Three predicted stable hairpin structures in RNA4 intergenic region

a. The hairpin structure of three 634 bp types isolates with two deletions; b. The hairpin structure of HA isolates with three bases variation; c. The same, stable hairpin structures among 19 isolates ΔG : The lowest free energy.

2.3 纤细病毒属病毒 RNA4 IR 同源性分析比较

与 RSV 同属的其它成员还有玉米条纹病毒(Maize stripe virus, MSpV)、水稻矮矮病毒(Rice grassy stunt virus, RGSV)、水稻白叶病毒(Rice hoja blanca virus, RHBV)、稗草白叶病毒(Echinochloa hoja blanca virus, EHBV)和尾稗草白叶病毒(Urochloa hoja blanca virus, UHBV)^[21]。分析结果表明各成员 RNA4 IR(RGSV 为 RNA6 IR)序列在长度上各不同,最长的是 RGSV,为 913nt,最短的是 UHBV,为 394nt。其中, RGSV 已有 3 个分离物全长序列登录 GenBank,这 3 个分离物 RNA6 IR 的同源率在 94% ~ 99% 之间。进一步分析表明纤细病毒属成员间的 RNA4 IR(RGSV 为 RNA6 IR)同源率在 33% ~ 51% 之间。其中,与 RSV 亲缘关系最近的 MSpV 同源率为 47%,亲缘关系最为接近的 RHBV、FHRV、UHRV 之间的同

源率均为 50% 左右,而与其它 4 种病毒的同源率较低,在 33% ~ 36% 之间;RGSV 虽然与其它成员间的亲缘关系较远,但与其它 5 种病毒间的同源率均为 44% 左右。这个结果表明,由于纤细病毒属 IR 变异较大,并不适用于病毒系统进化的依据,但在一定的范围内,可作为一种借鉴。由于 ICTV 第 7 次报告已将 IR 序列 60% 的同源率作为纤细病毒属病毒种间分类标准^[12],因此,本研究分析的各分离物都属于 RSV 不同的分离物,并不属于不同的病毒种。

3 讨论

纤细病毒属病毒分类一般是根据编码区序列,如 RNA2 编码的 94 kD 蛋白基因和外壳蛋白(Coat protein, CP)基因等^[12]。由于 RSV RNA4 IR 在长度上各不相同,且各分离物间序列变异较大,并不适用于 RSV 系统进化关系研究。对纤细病毒属各成员的 RNA4 (其中 RGSV 为 RNA6)IR 进行比较结果也表明 IR 不适用于病毒种间分类的依据。

序列分析结果表明我国 RSV 云南分离物变异类型较为复杂,而云南以外的分离物变异类型比较单一。由于云南省存在独特的生态条件和丰富的生物多样性,加上各地区间的水稻品种布局、种植结构及气候条件相差甚大,这些因素都造成了在复杂的生态环境下,RSV 与植物寄主及介体灰飞虱在长期的协同进化过程中遗传变异相对较高。

Blast 分析结果暗示了插入片段很有可能是病毒直接从寄主(大、小麦)基因组中通过重组(Recombination)获得的。Nagy 等^[13]在对雀麦花叶病毒(Brome mosaic virus, BMV)重组的一系列重要研究中发现,一个有效的同源重组热点(Hot-spot)应包括下游的 AU 碱基富集区和上游的 GC 碱基富集区,AU 区是中心区,而 GC 区是加强区。令人感兴趣的是,在 RNA4 IR 内同样存在类似的 AU 和 GC 碱基富集区,因此,RSV RNA4 IR 很可能是发生重组的热点区域。由于病毒基因组结构较为简单,其复制需寄主成分参与,当病毒在不同寄主内繁殖、复制时,很有可能获得寄主的基因组成分。本研究结果暗示了,RSV 在大麦、小麦及水稻等寄主体内反复复制传代时,很有可能由于病毒不断适应不同的寄主而导致病毒基因组发生变异的情况,如插入一段寄主的序列,即发生了病毒与寄主间的重组。

结果表明,各分离物 RNA4 IR 序列碱基变异较大,同源性不高,在 AU 碱基富集处可形成两个发夹结构,其中一个序列比较保守,形成的发夹结构稳定(平均 ΔG 为 -120 kJ),插入或缺失并没改变其稳定性,但另一个由于碱基变异导致其所形成的发夹结构的稳定性在各个分离物中差异较大,我国 RSV 各分离物这段序列所形成的发夹结构中,732 bp 片段发夹结构最不稳定(平均 ΔG 为 -8.4 kJ),654 bp 片段发夹结构最为稳定(ΔG 平均为 -19.3 kJ),而 634 bp 分离物的稳定性次之(ΔG 平均为 -10.1 kJ)。这些发夹结构最可能的功能是对间隔区两旁基因编码区转录终止及 ssRNA 稳定性起到调控作用,从而影响病毒的生物学性质。因此,从某种角度上,应该是这种复杂的结构而非核苷酸序列本身是参与病毒功能的重要因素。当然,稳定性较高的发夹结构的高度保守性最有可能是由于其在调控功能上的重要性,在病毒与寄主互作过程中所受到的负选择(Negative effect)压力限制较高所致的。

初步实验结果表明 1998 年分离的我国 RSV BJ1、PJ1、LY 及 JN 4 个分离物之间存在致病性差异,其中 BJ1 和 PJ1 分离物致病性最强,LY 分离物次强,而 JN 分离物致病性最

弱^[14]。进一步分析结果表明,各分离物的致病性差异与不稳定的发夹结构间似乎存在某种相关性。如在这 4 个分离物中,BJ1 和 PJ 分离物稳定性相似(ΔG 分别为 -24.4 kJ、 -23.1 kJ),JN 分离物最不稳定(ΔG 为 -8.4 kJ),LY 分离物稳定性次之(ΔG 为 -11.8 kJ)。因此,各分离物的致病性差异似乎与其发夹结构的稳定性成正相关关系,即其发夹结构的稳定性越强,致病性也越强,反之亦然。RSV RNA4 vRNA 上的 ORF 所编码的 SP 被认为是一种与病症有紧密相关的蛋白,是否可以认为各个分离物正是通过这种稳定性不同的发夹结构影响 IR 两旁 ORF 的转录终止及 ssRNA 的稳定性,进而导致其生物学性状特别是致病性差异呢?这是值得进一步研究的地方。

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. 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. 福建农业大学学报,2001,30(3):269~279.
- [3] Ramirez B C, Haenni A L. Molecular biology of tenuiviruses: a remarkable group of plant viruses. *J Gen Virol*, 1994, 75(3):467~475.
- [4] 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. 福建农业大学学报,1998,27(3):257~260.
- [5] 刘利华,吴祖建,林奇英,等. 水稻条纹叶枯病细胞病理变化的观察. 植物病理学报,2000,30(4):306~311.
- [6] Melcher U. The 30K 'superfamily' of viral movement proteins. *J Gen Virol*, 2000, 81(1):257~266.
- [7] Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA4 of rice stripe virus isolate T and comparison with another isolate and with maize stripe virus. *J Gen Virol*, 1992, 73(5):1309~1312.
- [8] Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, et al. Ambisense segment 4 of rice stripe virus: possible evolutionary relationship with phleboviruses and uukuviruses(Bunyaviridae). *J Gen Virol*, 1990, 71(7):1427~1432.
- [9] Auperin D D, Romanowski V, Galinski M, et al. Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J Virol*, 1984, 52(3):897~904.
- [10] Nguyen M, Ramirez B C, Goldbach R, et al. Characterization of the in vitro activity of the RNA-dependent RNA polymerase associated with the ribonucleoproteins of rice hoja blanca tenuivirus. *J Virol*, 1997, 71(4):2621~2627.
- [11] Qu Z, Liang D, Harper G, et al. Comparison of sequences of RNAs 3 and 4 of rice stripe virus from China with those of Japanese isolates. *Virus Genes*, 1997, 15(2):99~103.
- [12] de Miranda J R, Munoz M, Wu R, et al. Phylogenetic placement of a novel tenuivirus from the grass *Urochloa plantaginea*. *Virus Genes*, 2001, 22(3):329~333.
- [13] Nagy P D, Simon A E. New insight into the mechanisms of RNA recombination. *Virology*, 1997, 235(1):1~9.
- [14] 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. 福建农林大学学报(自然科学版)2002,31(2):164~167.

Sequence Analysis of Intergenic Region of Rice Stripe Virus RNA4 : Evidence for Mixed Infection and Genomic Variation

Wei Taiyun Lin Hanxin Wu Zujian Lin Qiyang Xie Lianhui*

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract : The intergenic region(IR) of the RNA4 of 22 isolates of Rice stripe virus(RSV) in China

was cloned and sequenced. The IR sequences were compared with one another and with that from Japan. Sequence comparisons showed that these isolates could be divided into three different types, with the IR length of 634 bp, 654 bp and 732 bp, respectively. It is interesting to note three different types all occurred in Yunnan RSV natural population, whereas other province only existed 654 bp type length isolates. Mixed infections with different types of IR length coexisting in some isolates in Yunnan was observed. IR sequences were not more conserved (83% ~ 100%) among the populations of RSV from China than with those of RSV isolates from Japan (83% ~ 94%). There were two important structure characteristics in IRs sequences. Firstly, there was a-19 nt insertion in 654 bp type isolates and a-103 nt in 732 bp type isolates in comparison to 634 bp type isolates. This inserted sequences were rather highly conserved. Blast analysis indicates the 16 nt (AGAAACATGAGAGTA) in 19 nt insertion was very similar in sequence to wheat cDNA library; and the 20 nt (AGAATTGCCTTGCTTAT) in 103 nt insertion was identical to a stretch sequences of barley cDNA library. Recombination hot-spot sequences existed in RNA4 IR. Secondly, IRs sequence was rich in U and A residues where two distant hairpin structures could be formed with computer-assisted folding analysis. One was highly conserved and stable, but the other was rather unstable because of bases variation. It is believed that this stabilised hairpin structure, rather than a sequence motif, might serve as a transcription terminator during the synthesis of mRNAs from the ambisense segments. Negative selection constraints imposed by secondary structure might have maintained the conserved sequences. In this paper, the relationship between the lowest free energy of the unstable hairpin structures and the different pathogenesis among some isolates was also discussed in this paper.

Key words :Rice stripe virus, RNA4 intergenic region (IR), Hairpin structure

Foundation item : Chinese National Science Foundation (30000002, 30240017); National Excellent Doctor's Degree Dissertation of High School Author Special Item Foundation (20015)

* Corresponding author. Tel 86-591-3769714; Fax 86-591-3769704; E-mail: xieli@ fjau.edu.cn

Received date :12-27-2002

《微生物学报》2004 年征稿计划

为了适应我国生物科技飞速发展的需要,促进国内外学术交流,本刊 2004 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目(即国家“863 计划”)和国家基础研究发展规划项目(即国家“973 项目”)
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目。
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目。
4. 国际合作项目。
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果,对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果。

对于高水平的论文本刊将优先发表。欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!