

中国甜菜坏死黄脉病毒 RNA5 的检测及其核苷酸序列分析*

李大伟 于嘉林 韩成贵 刘 涛 秦树才 刘 仪

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

Renate Koenig

(*Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie, Braunschweig, Federal Republic of Germany*)

摘 要 利用反转录-PCR 方法,对甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)5 个中国分离物的 RNA5 进行了检测,结果表明新疆分离物、黑龙江分离物和内蒙古乌拉特前旗分离物不含有 RNA5,只有包头分离物和呼和浩特分离物有 RNA5。序列分析结果,包头分离物和呼和浩特分离物 RNA5 基因组分别为 1338 nt 和 1358 nt,均只包含 1 个开放阅读框架,编码产生 26 kD 蛋白。与法国 F72 分离物和日本 D5 分离物相比,各分离物间核苷酸序列同源率为 93.7% ~ 98.5%,由此推导的氨基酸序列同源率为 91.8% ~ 98.2%。

关键词 甜菜坏死黄脉病毒, RNA5 基因组, 检测, 序列分析

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0461-65

由甜菜坏死黄脉病毒(*Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV*)侵染所引起的甜菜丛根病(*Rhizomania*)是一种毁灭性病害,广泛分布于世界各甜菜种植区。由于丛根病造成产量及含糖量的大幅度下降,50 年代曾导致意大利糖厂的倒闭。我国甜菜丛根病的危害比国外更加严重,1978 年在内蒙古的包头和呼和浩特发现该病,目前已扩大蔓延到新疆、宁夏、甘肃、黑龙江、吉林和辽宁等甜菜主产区,发病面积占全国甜菜种植面积的 2/5^[1]。由于携带病毒的甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)在土壤中可以存活 20 年以上,导致病地不能重茬,造成可种甜菜的土地日益减少,给我国制糖业的生存与发展带来极大威胁。我们在内蒙古等地调查发现,从欧洲引进的抗病品种大多表现为感病,现已知 RNA5 存在与否和 BNYVV 致病性的强弱有关,为深入研究不同地域 BNYVV 致病性的差异,有必要确认中国的 BNYVV 是否存在 RNA5 及其核苷酸序列变异程度。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

从内蒙古的包头市萨拉齐镇、呼和浩特市和乌拉特前旗、新疆石河子市和黑龙江的哈

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670035 和 39770492)。

注:本文报道的 BNYVV RNA5 核苷酸序列已登录于 DDBJ/GenBank/EMBL 数据库,登录号为 AJ236894(包头分离物)和 AJ236895(呼和浩特分离物)。

收稿日期:1999-03-01,修回日期:1999-06-02。

哈尔滨市分别采集甜菜丛根病重病区的病土,4℃冰箱中保存备用。

1.2 BNYVV 的粗提纯和病毒 RNA 的提取

将甜研 302 播种于上述病土中,3~4 周后镜检甜菜根部有 *P. betae* 并用 ELISA 法测定确认已被 BNYVV 侵染,收集病根,洗净晾干。液氮中研磨,加 10mL 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH9.0),纱布过滤去渣后,10000r/min 离心 10min,取上清,加 3mL 20%蔗糖垫,40000r/min 超离心 1h,将沉淀悬浮于灭菌水中,即得到病毒的粗提纯液。由粗提纯的病

1.3 BNYVV RNA5 全基因组 cDNA 的 RT-PCR 扩增

依据 Kiguchi 等^[3]报道的 BNYVV D5 分离物 RNA5 的核苷酸序列,设计并合成下列寡核苷酸引物:

BN-26 5'-GTCAATACACTGACAGAG-3'

BN-27 5'-AAATTCAAAGTACTTTCA-3'

其中 BN-26 与 D5 分离物 RNA5 的 1347~1230nt 互补,BN-27 与 1~18nt 相对应。

RNA5 全基因组 cDNA 的反转录和 PCR 扩增方法均同文献[2]。

1.4 克隆与筛选

基因克隆、连接、转化、质粒提取、酶切等基本分子生物学方法均参照 Sambrook 等^[4]的方法进行。将包头分离物和呼和浩特分离物的 RT-PCR 产物用 T4 DNA 聚合酶处理成平端后,分别克隆进入 pGEM-3Zf(+)和 pGEM-7Zf(+)的 *Sma* I 位点,经 PCR 扩增筛选和酶切鉴定,得到重组质粒。

1.5 序列测定和序列分析

采用 PE 公司的 Dye Terminator DNA Sequencing Kit 和 ABI-377 型 DNA 自动测序仪进行序列测定。首先采用 pUC/M13 通用测序引物对重组质粒插入片段的两端进行核苷酸序列测定,再根据所测序列设计合成引物 BN-28:5'-CCCAAGACACACTATCGG-3' (与包头分离物的 1040~1023nt 互补),利用 Dye Terminator 测序反应测定插入片段中间区域的序列。采用 Beckman 公司的 MicroGenie 序列分析软件对所测序列进行计算机分析,并与法国 F72 分离物^[5]和日本 D5 分离物的核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 BNYVV 中国分离物 RNA5 的 RT-PCR 检测和扩增产物的克隆

以 BNYVV 新疆分离物、黑龙江分离物和 3 个内蒙古分离物(包头市、呼和浩特市和乌拉特前旗)的总 RNA 为模板,经反转录和 PCR 扩增,只有包头分离物和呼和浩特分离物能扩增得到一特异的 1.35kb 的片段,说明这两个分离物含有 RNA5。

将包头分离物和呼和浩特分离物的 RT-PCR 产物经 T4 DNA 聚合酶处理成平齐末端后,分别克隆进入 pGEM-3Zf(+)和 pGEM-7Zf(+)的 *Sma* I 位点,经 PCR 筛选和酶切鉴定得到正向插入的重组质粒 pGBW527(包头分离物)和 pGBW710(呼和浩特分离物)。

2.2 序列测定和序列分析

采用双脱氧终止法对重组质粒 pGBW527 和 pGBW710 进行核苷酸序列测定。序列分析结果表明,BNYVV 包头分离物 RNA5 全长为 1338nt,呼和浩特分离物 RNA5 全长

为 1358nt(均不包括 polyA 尾序)。与法国的 F72(RNA5 为 1349nt)和日本 D5 分离物(RNA5 为 1347nt)相比,4 个分离物 3'端非编码区长度均为 212nt 且保守性高,而 5'端非编码区变异较大,其中 1~349nt 相对保守,变异区主要集中在 350nt 至起始密码子 ATG 这一区域(图 1)。不同分离物 RNA5 基因组核苷酸序列的同源性为 93.7%~98.5%。RNA5 基因组中只包含一个开放阅读框架(ORF),包头分离物的 ORF 位于 440~1126nt,呼和浩特分离物的 ORF 位于 460~1146nt,与 D5 分离物一样,都编码由 228 个氨基酸组成的 26kD 蛋白。与其它 3 个分离物相比,F72 分离物编码的 26kD 蛋白在 77 位 aa 前多 1 个 D,在 227 位 aa 前多 1 个 NDD 三肽,各分离物 26kD 蛋白氨基酸序列同源性为 91.8%~98.2%(表 1)。

所比较的 4 个分离物中,呼和浩特分离物和 D5 分离物的亲缘关系最近,其核苷酸序列和氨基酸序列同源性均在 98% 以上,两者的差异是在呼和浩特分离物 350~367nt 区域内,D5 分离物少了 11 个核苷酸(图 1),而其余 1347 个核苷酸中只有 10 个核苷酸发生了变异,因此这两个分离物应属同一类型。从氨基酸序列同源性看,包头分离物的 RNA5 与 F72 分离物亲源关系最远,而与 D5 分离物稍近。包头和呼和浩特虽然地理位置相距不远,但两地的 BNYVV 亲源关系较远,氨基酸序列同源性仅为 93.4%。

```

B   349 C----ATAAAAT----ATAAAAT-AAAATA----AAATAACTTGAATTATTAACAG   392
H   349 CAAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAAAATAACTTAAATTATTAATAG   405
D5  349 C----ATAAAAC-----AAAATAAAATAAAATAAAATAACTTAAATTATTAATAG   394
F72 349 C-----GTAAAAT-AAAATAAAATAAACAAATTGAATTATTAACAG   389

B   393 CAATTCGC-ATTTGCAAGTTGCG-----ATCATAATCATATTTACAATTTGTG   442
H   406 TAATTTGCAATTTGTAAGTTACGACTATAATTATAATTATAATTACAATTTGTG   462
D5  395 TAATTTGCAATTTGTAAGTTACGACTATAATTATAATTATAATTACAATTTGTG   451
F72 390 TAATTTGCAATTTGCAAGTTGCG-----ATCACAATTATATTTACAATTTGTG   440

```

图 1 BNYVV4 个分离物 ATG 上游相同区域核苷酸序列的比较

Fig. 1 Nucleotide sequences comparison of ATG upstream region from BNYVV RNA5

B. Baotou isolate ; H. Huhhot isolate

表 1 BNYVV 不同分离物 RNA5 核苷酸序列及其编码的 26kD 蛋白氨基酸序列同源性比较

Table 1 Comparison of RNA5 nucleotide sequences and deduced 26 kD protein amino acid sequences from different BNYVV isolates(%)

Isolates	Huhhot		D5		F72	
	Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid
Baotou	94.8	93.4	95.7	95.2	95.1	91.8
F72	93.7	92.7	94.9	94.4		
D5	98.5	98.2				

3 讨 论

BNYVV 是一种由 *Polymyxa betae* 传播的多分体 ss(+)RNA 病毒,不同分离物含

4~5个 RNA 组分,其中 RNA5 仅存在于法国的 Pithivers 分离物以及中国和日本的一些田间分离物中,其它国家的 BNYVV 分离物中尚未检测到。在 BNYVV 5 个中国分离物中,只在丛根病重病区的包头和呼和浩特发现了 RNA5,而在轻病区的黑龙江未检测到 RNA5(二次重复)。新疆和内蒙古的乌拉特前旗也是丛根病的重病区,由于所测土样只有一个,不具有广泛性,尚需扩大样品采集范围,才能最终确定这两个分离物是否含有 RNA5。

无论是汁液摩擦接种还是以 *P. betae* 为介体的自然传播,只有 RNA1 和 RNA2 是 BNYVV 侵染所必需的。但是,在 BNYVV 田间分离物中总是存在 RNA3 和 RNA4(有时还有 RNA5)这一事实又说明,病毒在田间的生存是需要这些组分的。关于 RNA5 在病毒侵染、复制和介体传毒中的具体作用并不十分清楚,日本 Tamada 通过实验证明^[6],虽然 RNA3 是甜菜丛根病症状形成的决定因子, RNA4 控制 *P. betae* 传播 BNYVV 的效率,但含有 RNA1+2+3+4 或者 RNA1+2+4+5 的分离物不仅比只含有 RNA1+2+4 的分离物更容易被真菌传播,而且能引起甜菜根重和含糖量的显著下降,说明 RNA3 和 RNA5 在介体传毒和致病过程中与 RNA4 具有协同效应。实际上, RNA3、RNA4 和 RNA5 可能是通过不同的途径促进病毒对根系的侵染, RNA4 增加由介体传播引起的对植株的再侵染, RNA3 和 RNA5 提高由初侵染位点和再侵染位点进行系统扩展的能力,进而增加根部症状的严重度,因此 BNYVV 的 RNA3 和 RNA5 都可能与病毒的致病性有关。

法国的 Pithivers 城是甜菜丛根病最严重的病区之一,欧洲甜菜育种界一直认为,只有在 Pithivers 表现抗病才是真正的抗丛根病品种,但并不清楚这一现象的内在原因。Koenig 等^[5]根据在欧洲只有 Pithivers 分离物含有 RNA5,而其它 BNYVV 分离物不含有 RNA5 的检测结果,认为 Pithivers 分离物含有 RNA5 是其具有较强致病力的主要原因。在前期的研究工作中,我们证实内蒙古分离物 RNA3 编码的 25kD 蛋白与欧洲分离物氨基酸序列同源性只有 90%^[7],而 RNA5 编码的 26kD 蛋白与 Pithivers 分离物的氨基酸序列同源性也仅为 91.8%~92.7%(见表 1),说明 BNYVV 内蒙古分离物与致病力相关的 25kD 蛋白和 26kD 蛋白与欧洲分离物相比确有较大差异,至于这种差异是否是内蒙古分离物致病力强,进而导致欧洲甜菜抗病品种在中国丧失抗性的根本原因,正在进一步研究之中。

参 考 文 献

- [1] 高锦梁,邓峰,刘仪等. 植物病理学报, 1983, 13(2):1~4.
- [2] 李大伟,韩成贵,于嘉林等. 植物病理学报, 1997, 27(4), 303~307.
- [3] T. Kiguchi, M. Saito, T. Tamada. *J. Gen. Virol.*, 1996, 77:575~580.
- [4] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [5] R. Koenig, A. M. Haeberleli, M. Commandeur. *Arch Virol.*, 1997, 142:1499~1504.
- [6] K. E. Richards, T. Tamada. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1992, 30:291~313.
- [7] 李大伟,于嘉林,韩成贵等. 病毒学报, 1998, 14(2):165~171.

Detection and Nucleotide Sequence Analysis of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA5 Isolated from China*

Li Dawei Yu Jialin Han Chenggui Liu Tao Qin Shucui Liu Yi

(National Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Renate Koenig

(Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie und Planzenvirologie, Braunschweig, Federal Republic of Germany)

Abstract Using RT-PCR method, the RNA5 genomic component was detected for five beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolates from China. The result shows that RNA5 was only found in Baotou isolate and Hohhot isolate, but not in Xingjiang isolate, Helongjiang isolate and Wulate isolate. Nucleotide sequence analysis shows that the RNA5 genome of Baotou isolate and Hohhot isolate has 1338nt and 1358nt in length respectively, which contain single open reading frame (ORF) encode protein with molecular weights of 26kD. Comparing with the published sequences of F72 and D5 isolates, they share 93.7% ~98.5% nucleotide identity and 91.8% ~98.2% amino acid identity each other.

Key words Beet necrotic yellow vein virus, RNA5 genome, detection, sequence

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39670035 and 39770492). The Nucleotide Sequence Data Reported in this Paper have been Submitted to DDBJ/GenBank/EMBL Database with the Accession Number AJ236894 (Baotou isolate) and AJ236895 (Hohhot isolate).