

# 玉米矮花叶病毒研究进展

蒋军喜 李桂新 周雪平

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

**摘要:** 玉米矮花叶病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) 是在世界范围内广泛分布的重要病毒, 文中从寄主范围、传播、株系状况、分子生物学及检测等方面, 对 MDMV 的国内外研究现状进行了阐述。

**关键词:** 玉米矮花叶病毒, 株系, 分子生物学, 检测

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0077-05

玉米矮花叶病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) 是在世界范围内广泛分布的一种病毒, 该病毒于 1965 年在美国首次发现<sup>[1]</sup>。我国于 1968 年在河南新乡、安阳首见玉米矮花叶病, 1973 年确证了病原物为 MDMV。MDMV 属马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员, 病毒粒子弯曲线状, 大小约  $750 \times 14\text{nm}$ , 沉降系数为 165 ~ 175S, CsCl 水溶液中的浮力密度为  $1.300\text{g/mL}$ 。MDMV 粒体中核酸占 5% ~ 6%, 蛋白占 94% ~ 95%, 基因组为单链线性 RNA (ssRNA), 分子量为  $3.0 \sim 3.5 \times 10^6$  daltons, 外壳蛋白单组分, 分子量约 30kD。有关 MDMV 的研究已有很多报道, 现将研究进展综述如下。

## 1 MDMV 的寄主范围

MDMV 的寄主范围较窄, 仅限于禾本科植物。Williams 等<sup>[1]</sup>通过温室接种发现 MDMV (MDMV-A) 能侵染甘蔗、高粱、玉米、约翰逊草、野甘蔗、黍、粟、狗尾草等 15 种禾本科作物及杂草。Rosenkranz<sup>[2]</sup>对 MDMV 的寄主范围做了系统研究, 共测定了 89 属 333 种禾本科植物对 MDMV 的感染性, 结果发现有 293 种植物被感染。试验中同时发现 MDMV-A 株系的寄主范围广, 而 MDMV-B 株系的寄主范围与甘蔗花叶病毒 (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) 的寄主范围相似, 比较窄。我国的史春霖等<sup>[3]</sup>对北京地区的 MDMV (MDMV-B) 作了寄主范围测定, 在供试的 21 种禾本科植物中, 发现能被 MDMV 侵染的有画眉草、野雀麦、虎尾草、蟋蟀草、小米、黍、稗、马唐、青狗尾草、高粱、大油芒、矛叶荻草、玉米等 13 种, 不能侵染的有大麦、小麦、黑麦、金丝雀麦草、约翰逊草、燕麦、草原看麦娘、水稻等 8 种。

## 2 MDMV 的传播

与 *Potyvirus* 属中其他病毒一样, MDMV 主要由机械传播或由蚜虫以非持久性方式传播, 并且 MDMV 还可以种传。

国外报道 MDMV 的传毒蚜虫至少有 23 种。我国研究表明麦二叉蚜 (*Schizaphis graminum*)、禾缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*)、桃蚜 (*Myzus persicae*)、玉米蚜 (*Rhopalosiphum maidis*)、麦长管蚜 (*Macrosiphum avenae*)、棉蚜 (*Aphis gossypii*)、豚草蚜 (*Dact-*

*gnotus ambrosiae*)、无网长管蚜 (*Acythosiphum dirhodum*) 和甘蓝蚜 (*Brevicoryne brassicae*) 9种蚜虫能传播MDMV-B<sup>[4]</sup>。蚜虫的获毒时间10~30s,持毒时间一般为30~240min,但少数蚜虫的持毒时间可超过19h,这些蚜虫有可能长距离传播MDMV。

对MDMV的蚜传机制近年有所了解。马占鸿等<sup>[4]</sup>采用免疫荧光(FITC)标记方法观察到几种介体蚜虫口针中存在MDMV的附着位点(VAS),并且发现传毒效率越高的蚜虫,其VAS越明显,此VAS已鉴定为56kD的可溶性蛋白。VAS不能直接与MDMV结合,必须由辅助成分-蛋白酶(HC-Pro)介导,HC-Pro一端连接病毒,一端连接VAS,在蚜虫传播MDMV的过程中起桥梁作用。蚜虫对MDMV的传播被认为是一个“识别-吸附-释放”的过程<sup>[4]</sup>。

MDMV能经玉米种子传播。对我国玉米种子测定表明,种子带毒率因品种不同而有差异<sup>[5]</sup>。研究表明玉米种子的种表、种皮组织、胚乳均携带MDMV-B,但胚不携带MDMV-B;种表携带的MDMV-B无侵染活性,种皮组织携带的侵染活性低(8.9%),胚乳携带的侵染活性高(89.2%)。对玉米病株花粉的dotELISA和RT-PCR检测表明,病株花粉中无MDMV-B存在,因而可以初步认为玉米花粉不能传播MDMV-B。

### 3 MDMV的株系及归属

MDMV先后有MDMV-A、MDMV-B、MDMV-C、MDMV-D、MDMV-E、MDMV-F、MDMV-KS1和MDMV-O 8个株系的报道,这些株系总体上可分为能侵染约翰逊草和不能侵染约翰逊草两类。1965年Willams等<sup>[1]</sup>首次报道的美国Ohio州的MDMV在后来的株系研究中作为MDMV-A株系,MDMV-A的重要特征是能侵染约翰逊草。1966年Mackenzie等<sup>[6]</sup>发现美国东北部数州的MDMV不能侵染约翰逊草且与Ohio州的MDMV表现微弱的血清学关系,因而将美国东北部数州的MDMV命名为MDMV-B株系。1975年Louis等从Ohio州南部的MDMV中鉴定出MDMV-C、MDMV-D、MDMV-E和MDMV-F 4个株系,这4个株系的共同点是能侵染约翰逊草,但它们彼此间及与MDMV-A在玉米自交系N30上的症状及蚜虫传播效率不同。1984年Jarjees等用血清学方法研究MDMV与SCMV的关系时,发现来自Kansas州的MDMV 1号分离物具有与众不同的血清学反应,便将此分离物鉴定为MDMV-KS1株系。1985年McDaniel等<sup>[7]</sup>将Texas州的MDMV分离物鉴定并命名为MDMV-O株系,依据是该分离物能感染燕麦,与MDMV-A、MDMV-B株系无血清学关系。

90年代初,侵染禾本科植物的Potyvirus属病毒由SCMV和MDMV2种病毒划分为SCMV、MDMV、约翰逊草花叶病毒(Johnsongrass mosaic virus, JGMV)和高粱花叶病毒(Sorghum mosaic virus, SrMV)等4种病毒,并将这4种病毒组成SCMV亚组<sup>[8]</sup>。由此,MDMV的意义及包含的株系便发生了变化。定义后的MDMV只包含原先MDMV 8个株系中的5个株系,即MDMV-A、MDMV-C、MDMV-D、MDMV-E、MDMV-F,其余3个株系中,MDMV-B归在SCMV中并改称SCMV-MDB;MDMV-O和MDMV-KS1归在JGMV中,相应改称为JGMV-MDO和JGMV-MDKS1。由于MDMV-C株系在研究中已丢失,MDMV-D、MDMV-E、MDMV-F等3个株系研究得很少,所以实际工作中所说的MDMV常指MDMV-A株系。

我国学者对MDMV的株系也进行了研究。1979年史春霖等<sup>[3]</sup>将北京郊区玉米和高粱上的3个MDMV分离物均鉴定为MDMV-B株系,依据是这些分离物能侵染约翰逊草。

1985年邓汀钦等基于能侵染约翰逊草以及能与MDMV-B发生血清学反应将台湾的MDMV鉴定为MDMV-B株系。1986年朱福成等用鉴别寄主对采自我国8省(市)的毒源标本进行了鉴定,认为这8省(市)的玉米矮花叶病的毒源主要是MDMV-B,另外还有SCMV和FPMV(白草花叶病毒)。1986年石银鹿等<sup>[9]</sup>将山西省玉米矮花叶病毒源鉴定为MDMV-B和MDMV-G株系,MDMV-G株系为首次报道,俗称MDMV白草株系,它与MDMV-B有许多相似之处,但在3个高粱鉴别品种上的症状与MDMV-B不同。1993年杨家秀等基于鉴别寄主反应认为四川省玉米矮花叶病的主要毒源为SCMV,占81.5%,次要毒源为MDMV-B,占18.5%。1999年吴建宇等<sup>[10]</sup>根据能否侵染约翰逊草及血清学反应,将南京郊区的MDMV鉴定为MDMV-B株系。最近蒋军喜等对MDMV浙江分离物近全长外壳蛋白(CP)基因进行了碱基测序,所测序列与GenBank中的已知序列进行比较,结果与MDMV-B(北京分离物)同源性最高,达97%(待发表),看来浙江分离物也属于MDMV-B。上述研究表明,我国玉米矮花叶病毒源主要是MDMV-B,其次是SCMV、MDMV-G和FPMV,鉴于MDMV-B已归于SCMV中并改称SCMV-MDB株系,故可以初步认为我国玉米矮花叶病的毒源主要为SCMV。

#### 4 MDMV及其相关病毒的分子生物学研究

MDMV及其相关病毒SCMV、JGMV、SsMV的多个株系基因组3',端序列已测定,并且JGMV和MDMV已有基因组全序列报道。1993年Gough等<sup>[11]</sup>测定了JGMV-JG基因组全序列并阐明了基因组结构,JGMV-JG基因组共9766核苷酸(nt),5'端非翻译区(UTR)和3'-UTR各为135核苷酸(nt)和475nt,含有一个大的开放阅读框(ORF),编码3052氨基酸(aa)。JGMV多聚蛋白含有Potyvirus属保守的蛋白酶切割基序(motif),但在切点-1位置多为谷氨酸(E)而不是谷氨酰胺(Q)。多聚蛋白被切割成10种不同功能的蛋白,这10种蛋白与Potyvirus属中烟草蚀纹病毒(TEV)对应的10种蛋白进行同源性比较,结果发现复制酶基因(NiB)最保守(同源性56%),P1蛋白变易最大(同源性23%)。1998年Kong等<sup>[12]</sup>测定了MDMV-Bg(保加利亚分离物,经序列对比属于MDMV-A)的基因组全序列并阐明了基因组结构。MDMV-Bg基因组共9515nt,ORF编码的多聚蛋白含3042aa,5'-UTR和3'-UTR各为250nt和139nt,其多聚蛋白切割成的10种蛋白与TEV对应的10种蛋白进行同源性比较,也是NiB最保守(同源性67.3%),P1变易最大(同源性24.9%)。将MDMV-Bg、JGMV-JG及TEV其他Potyvirus属病毒的多聚蛋白氨基酸序列进行同源性比较,结果JGMV-JG与MDMV-Bg的同源性最高(60%),而JGMV-JG、MDMV-Bg与其他15种Potyvirus属病毒的同源性平均各为44.2%和55.4%,表明在上述病毒中JGMV-JG与MDMV-Bg的亲缘关系最近。MDMV的多种蛋白中存在许多功能重要的motif,一些是Potyvirus属共有的,如CI蛋白中结合NTP的motif G<sub>1195</sub>AVGCSCKST<sub>1204</sub>,NiB中执行复制酶重要功能的motif G<sub>2579</sub>DD<sub>2581</sub>,HC-Pro中负责病毒长距离运输的motif C<sub>526</sub>CCVT<sub>531</sub>,CP N-端与蚜传相关的motif DAG,CP核心区与病毒在细胞间运输有关的motif V(I)RGS;另一些motif只存在于MDMV和JGMV中,如CI蛋白中的motif STIHL和Cx(17)CAG;还有一些motif是MDMV独有的,如P3与6K1切点附近结合NTP的motif G<sub>1036</sub>VIHEGKS<sub>1049</sub>、NiB C-端结合脂蛋白的motif I<sub>2554</sub>LAFNY-TLLSC<sub>2564</sub>。1993年Murry等<sup>[13]</sup>进行了转MDMV-B(现为SCMV-MDB)CP基因的研究,转

基因玉米不仅能抵抗 MDMV-B、MDMV-A 的侵染,而且能抵抗 MDMV 和玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV) 的混合侵染。

近年来,分子生物学检测技术开始用于 MDMV 的检测。Marie-Jeanne 等<sup>[14]</sup>根据 *Potyvirus* 属 CP 核心区含有的两个保守基序 (motif) MVWCIEN 和 QMKAAA 设计引物,用 RT-PCR 方法对 *Potyvirus* 属 SCMV 亚组 4 种病毒中的 22 个已知株系、40 个未知分离物及 2 个人为混合株系侵染的病样进行检测鉴定,结果每个病样都扩增出一条 327bp 的片段,符合预计长度,尽管试验中 PVY 等双子叶 *Potyvirus* 属病毒也扩增出相同大小的片段,但由于双子叶 *Potyvirus* 属病毒不感染禾本科植物,故根据此片段就可断定所测病样均为 SCMV 亚组病毒感染。在此基础上用限制性内切酶 *AluI* 和 *DdeI* 分别对以上扩增片段进行酶切做 RFLP 试验,结果除 Israeli 分离物外,其他样品扩增条带的酶切图谱构成 4 种类型。经过 RFLP 这一步,就明确了病样由 SCMV 亚组中的何种病毒侵染。接着,对同一种病毒中的扩增片段进行测序,从测序结果就可鉴定到株系。Israeli 分离物扩增片段测序结果进一步证明,Israeli 分离物是 SCMV 亚组中的一种新病毒。混合侵染病样扩增条带的 RFLP 图谱由已知两种株系的 RFLP 图谱构成,据此,Marie-Jeanne 认为 RT-PCR 结合 RFLP 方法可检测混合株系的侵染。

近年我国也开展了 MDMV 及其相关病毒的分子生物学研究。1995 年赛吉庆等克隆并在 *E. coli* 中表达了北京郊区的 MDMV-B CP 基因。最近范在丰<sup>[15]</sup>等对玉米矮花叶病毒原北京分离物的基因组 RNA 进行了全序列测定,全序列长 9.6kb,编码的多聚蛋白含 3063aa,与 MDMV-Bg 基因组全序列的同源性为 69%,多聚蛋白的同源性为 74%,根据 *Potyvirus* 属的分类标准,认为 MDMV 原北京分离物与 MDMV-Bg 应属于两种不同的病毒。MDMV 原北京分离物的 CP 含 313aa,与 SCMV-MDB 的氨基酸序列同源性为 87%,而与 SCMV 的一个欧洲分离物 (SCMV-C96) 的氨基酸序列同源性达 94%,认为 MDMV 原北京分离物与 SCMV-MDB 属于同一病毒的不同株系,而与 SCMV-C96 属于同一病毒的近缘株系。

## 5 结语

从 1965 年 MDMV 在美国 Ohio 州的发现至今,MDMV 的研究持续了 30 多年。由于 MDMV 在世界范围的广泛分布和引起玉米、高粱发生严重的病害,许多国家都对 MDMV 进行了研究。在 MDMV 的研究中,MDMV 的株系鉴定及归属研究开展得最多,由 MDMV 的株系鉴定及归属带动了整个侵染禾本科的 *Potyvirus* 属病毒的分类研究。目前,对侵染禾本科的 *Potyvirus* 属病毒分类取得了一致的结论,这个结论是侵染禾本科的 *Potyvirus* 属病毒关系密切,共同构成 SCMV 亚组,SCMV 亚组有 4 种病毒,即甘蔗花叶病毒 (SCMV)、玉米矮花叶病毒 (MDMV)、约翰逊草花叶病毒 (JGMV) 和高粱花叶病毒 (SrMV)。对 MDMV 株系划分及归属也有了定论,现在的 MDMV 只包含 MDMV-A、C、D、E、F 五个株系,原先意义上 MDMV 中另外 3 个株系分别划归于 SCMV (MDMV-B) 和 JGMV (MDMV-O、MDMV-KS1)。我国的 MDMV 研究从 70 年代末开始,经历了 20 余年,90 年代中期以前的主要工作是用生物学及血清学方法鉴定 MDMV 的株系,90 年代中期以后,我国对 MDMV 的研究迅速增加,着重研究了 MDMV 的蚜传机制和种传规律。目前,我国对 MDMV 的蚜传机制及种传规律研究走在世界前头,但在许多方面如 MDMV 的株系鉴定及归属、分子生物学研究等方面还没有很好地开展。玉米矮花叶病在我

国广泛分布, 但只有少数省份对其玉米矮花叶病作了毒源鉴定, 基本明确为 MDMV-B (SCMV-MDB), 而其他许多省份的玉米矮花叶病并未作毒源鉴定, 它们究竟是属于 MD-MV-B 株系还是属于 SCMV 亚组中其他种类的病毒或为多种病毒的复合侵染还有待明确。因此, 需要进一步明确病毒种类, 了解玉米矮花叶病的流行规律, 为抗病育种打下基础。

### 参考文献

- [1] Williams E, Alexander L J. *Phytopathology*, 1965, 55: 802 ~ 804.
- [2] Rosenkranz E. *Phytopathology*, 1987, 77: 598 ~ 607.
- [3] 史春霖, 徐绍华. *植物病理学报*, 1979, 9 (1): 35 ~ 40.
- [4] 马占鸿, 李怀方, 裘维蕃. *植物病理学报*, 1998, 28 (1): 25 ~ 28.
- [5] 马占鸿, 李怀方, 裘维蕃, 等. *玉米科学*, 1997, 5 (2): 72 ~ 76.
- [6] McDaniel L L, Gordon D T. *Phytopathology*, 1989, 79 (1): 113 ~ 120.
- [7] Mackenzie D R, Wernham C C, Ford E. *Plant Disease Reporter*, 1966, 50 (11): 814 ~ 818.
- [8] Shukla D D, Frenkel M J, Mckern N M. *Archives of Virology*, 1992 (Suppl 5): 363 ~ 373.
- [9] 石银鹿, 张琦, 王富荣, 等. *植物病理学报*, 1986, 16 (2): 99 ~ 104.
- [10] 吴建宇, 盖均镞. *南京农业大学学报*, 1999, 22 (2): 117 ~ 118.
- [11] Gough K H, Shukla D D. *Intervirology*, 1992, 36: 181 ~ 192.
- [12] Kong P, Steinbiss H H. *Archives of Virology*, 1998, 143: 1791 ~ 1799.
- [13] Murry E, Elliott G, Capitani A, *et al.* *Bio/Technology*, 1993, 11: 1559 ~ 1564.
- [14] Marie-Jeanne V, Ios R, Peyre J, *et al.* *Phytopathology*, 2000, 148: 141 ~ 151.
- [15] 范在丰, 陈红运, 李怀方, 等. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (1): 12.