

黄瓜花叶病毒番茄蕨叶分离物外壳蛋白基因的克隆和序列分析

田兆丰¹, 裘季燕¹, 丁翠珍¹, 刘伟成¹, 魏 蕾², 刘德文¹

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 2. 北京市农科院农业科技信息研究所, 北京 100097)

摘要: 在北京延庆的番茄上分离到 1 株黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)分离物 CMV-YQ, 该分离物在番茄上造成严重的蕨叶、矮化, 在烟草上表现花叶、矮化和畸形, 表现出很强的致病性。根据黄瓜花叶病毒外壳蛋白(coat protein, CP)基因的保守序列设计引物, 利用 RT-PCR 技术对其 CP 基因片段进行了扩增并克隆, 获得了含该基因全长 657 bp 的 cDNA 片段。序列测定与比较分析结果表明, 北京地区造成番茄蕨叶的 CMV 分离物 CP 基因片段核苷酸序列与 GenBank 上 CMV 亚组 I 其他分离物同源性高达 90%~99%, 属于 CMV 亚组 I。该分离物与分离于我国芭蕉的另一亚组 I 分离物 GB 同源性为 94.37%, 两分离物之间存在寄主适应性变异。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 番茄分离物; 外壳蛋白基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S436.421 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0203-04

Cloning and Sequencing of Cucumber Mosaic Virus Coat Protein Gene from Tomato

TIAN Zhao-feng¹, QIU Ji-yan¹, DING Cui-zhen¹, LIU Wei-cheng¹, WEI Lei², LIU De-wen¹

(1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Institute of Information on Science and Technology of Agriculture, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: A Cucumber mosaic virus (CMV) isolated from tomato which was grown in Yanqing County of Beijing was obtained. It induced severe symptoms of dwarf and linear leaf in tomato plants and mosaic, deformation and dwarf in tobacco. Primers were designed according to the conservative sequences of coat protein genes of CMVs and RT-PCR was used to clone the coat protein gene. Sequence analysis revealed that the coat protein gene comprised of 657 nucleotides encoding a protein of 218 amino acids and shared 90%–99% sequence homology with CMV subgroup I strains from GenBank, belonging to CMV subgroup I. It shared 94.37% sequence homology with a subgroup I isolate CMV-GB from Chinese banana and showed somewhat differentiation.

Key words: Cucumber mosaic virus; Tomato isolate; Coat protein gene; Sequence analysis

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)因其发生的普遍性和所引起病害的严重性, 已成为农作物以及重要经济作物上危害最大的植物病毒之一, 它能侵染 85 科的 1 000 多种植物^[1]。该病毒具有典型的三分体单链正义 RNA (+ssRNA) 病毒的特点, 其中 CMV RNA3 编码 2 个蛋白质, 即 3a 运动蛋白(Cell to cell movement protein, MP)和外壳蛋白(Coat protein, CP)。3a 蛋白决定病毒在植物体内的细胞间

扩散; CP 亚基组成病毒粒子的外壳, 起到保护核酸的作用, 还与病毒的寄主范围、症状^[2]、长距离运输^[3,4]及蚜虫传播能力^[5]有关。所以, CP 基因对 CMV 分组和株系划分有非常重要的意义。目前, 已报道或 GenBank 登陆的已有近 15 个 CMV 基因组全序列和约 60 个 CP 基因序列。CMV 被划分为 2 个亚组, 即亚组 I 和亚组 II, 2 个亚组分离物在世界范围均有分布。CMV 在我国的发生十分普遍, 我国学

收稿日期: 2006-08-29

基金项目: 北京市自然科学基金资助(5002005)

作者简介: 田兆丰(1966-), 女, 山西榆社人, 副研究员, 在读博士, 主要从事植物病毒及其生物防治的研究工作。

者已从十字花科、茄科、豆科及葫芦科等 38 科 120 多种植物上分离到 CMV^[6]。CMV 尤其在茄科植物,如柿椒、番茄上发生相当普遍,危害和损失也十分严重^[7-9]。我们对从番茄上分离到的造成番茄蕨叶的 CMV-YQ 分离物进行了克隆及序列分析,以期获得 CMV 基因组变异以及功能多样性的信息,对今后 CMV 抗病基因工程育种具有一定的参考价值。

1 材料和方法

1.1 酶与试剂

用于分子克隆的 pGEM-T easy Vector, RT-PCR 试剂盒、PCR 试剂盒、PCR 产物回收试剂盒等分子生物学试剂均购自美国 Promega 公司,质粒提取试剂盒为 OMEGA 公司产品,其余酶制剂为 TaKaRa 公司产品。

1.2 病毒分离物来源

分离物 YQ 于 2004 年 10 月分离自北京延庆呈蕨叶症状的番茄,在苋色藜上经过 3 次单斑分离纯化,繁殖保存在三生烟上。

1.3 病毒基本生物学测定

以三生烟为传毒寄主,以桃蚜、棉蚜及萝卜蚜等北京地区常见的蚜虫为介体对此病毒分离物进行传毒效率研究。同时进行致病力、致死温度、稀释限点及体外保毒期等稳定性测定,以上试验均按常规方法进行。供试烟草植株在温室中培养,每处理接种烟苗 15 株,共设 3 个重复。

1.4 病叶总 RNA 的提取

采集三生烟上系统症状明显的顶部嫩叶,采用 TE3D 法提取病叶总 RNA。-80℃保存。

1.5 引物的设计与合成

参照 GenBank 收录的 CMV 的 RNA3 全序列和部分序列设计合成 PCR 引物,上游引物 P1: 5'-ATG-GACAAATCTGAATCAACC-3' (5'端引物),下游引物 P2: 5'-TAAGCTGGATGGACAACCCGT-3' (3'端引物),5'端引物与 CMV 亚组 I Fny 株系 RNA3 的 1 257 ~ 1 277 nt 或亚组 II Q 株系 RNA3 的 1 220 ~ 1 240 nt 相同;3'端引物与 CMV-Fny 株系 RNA3 的 2 014 ~ 2 034 nt 或 Q 株系 RNA3 的 1 991 ~ 2 011 nt 互补。

1.6 逆转录

取 5 μL 病叶总 RNA,加入 1 μL 3'端引物 (100 μmol/L),1 μL dNTP (10 mmol/L),2 μL 逆转录缓冲液,9 μL DEPC-H₂O,65℃ 5 min,冷却至 42℃,加入逆转录酶 1 μL (10 单位),Rnasin 1 μL (15 单位),42℃保温 1 h,72℃ 15 min,-20℃冰箱保存。

1.7 PCR 扩增及产物纯化

取 5 μL 逆转录产物为模板,参照试剂盒在 25

μL 体系中进行 PCR 扩增,循环参数为 94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,50℃复性 45 s,72℃延伸 1 min,经 30 个循环后,72℃ 10 min 使产物延伸完全。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,并用回收试剂盒纯化回收。

1.8 CP 基因的克隆和重组子的筛选

扩增产物经 PCR 回收试剂盒纯化后,按 Promega 公司的 pGEM-T easy Vector 试剂盒说明进行连接反应,转化到 *E. coli* TG1 感受态细胞。在 LB 培养基上 37℃培养 16 h,挑取白色菌落,提取质粒 DNA。经 PCR 扩增鉴定重组质粒。

1.9 DNA 序列测定与分析

选择 1 个重组质粒,委托上海博亚生物技术有限公司北京分部进行序列的测定。采用 DNASTar 软件分析 YQ-CP 分离物与来源于我国芭蕉的 CMV 亚组 I 分离物 GB 外壳蛋白基因序列的同源性。

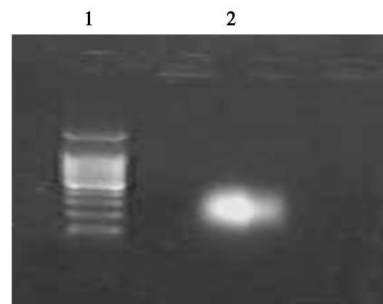
2 结果与分析

2.1 生物学特性研究

该 CMV 分离物 YQ 在三生烟、心叶烟上表现很强的致病力,从 18 ~ 35℃温度范围内的症状都表现了比较严重的花叶斑驳、畸形、植株矮化以致坏死。该病毒分离物的致死温度为 55 ~ 60℃,稀释限点为 1 000 ~ 10 000,体外存活期为 4 ~ 5 d,表现了较强的生命力。蚜传试验表明,北京地区常见的几种蚜虫对 CMV-YQ 分离物传毒效率分别为:桃蚜传毒效率约为 55%,棉蚜传毒效率约为 30%,萝卜蚜传毒效率约为 60%。

2.2 CMV-YQ 分离物 CP 基因克隆

回收的 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体,转化到 *E. coli* TG1 感受态细胞,提取质粒 DNA,经 PCR 扩增鉴定重组质粒,获得预期大小的目标条带 (图 1)。



1. Marker; 200 bp ladder;

2. 经 PCR 扩增获得的 CP 基因回收片段 (600 bp 左右)

1. Marker; 200 bp ladder; 2. Purifying fragment of coat protein gene

图 1 RT-PCR 扩增产物 (CP) 回收电泳

Fig. 1 Purification of RT-PCR products

2.3 YQ-CP 分离物与 CMV 分离物外壳蛋白基因同源性比较

测序结果表明 YQ-CP 基因全长 657 bp, 编码 218 个氨基酸, 序列测定与比较分析结果表明, 北京地区造成番茄蕨叶的 CMV 分离物 CP 基因片段核苷酸序列与 GenBank 上 CMV 亚组 I 其他分离物同源

性为 90%~99%, 属于 CMV 亚组 I。与分离于我国芭蕉的另一亚组 I 分离物 GB^[10] 同源性为 94.37% (图 2), 变异的碱基以 C-T 之间的变异为主, 占变异碱基总数的 40.5%。相比之下, 来源于两个不同寄主的 CMV 分离物同源性并不是很高, 两者存在寄主适应性变异。

CMV-YQ	1	ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGTCTGGTCGTAACCGTCGACGTCGTCCGCGTCTGGT	60
CMV-GB	1	-----	60
CMV-YQ	61	TCCCGCTCCGCTTCTCCTCCGCGGATGCCAACTTTAGAGTCCTGTCGCAGCAACTTTTCG	120
CMV-GB	61	-----C-----T-----A-G-----	120
CMV-YQ	121	CGACTTAATAAGACGTTGGCAGCTGGTCGCTCTACCATTAAACCCCAACCTTTGTAGGG	180
CMV-GB	121	---G-----A-----A-T-----G-T	180
CMV-YQ	181	AGTGAACGTTGTAAACCTGGGTACACGTTACATCTATTACCCTGAAGCCACCGAAAATA	240
CMV-GB	181	-----G-----C-----A-----	240
CMV-YQ	241	GACCGCGGCTCTTATTATGGTAAAGGTTGTTATTACGTGATTCAGTCACGGAATTCGAT	300
CMV-GB	241	-----T-----C-T-----G-----G-----	300
CMV-YQ	301	AAGAAGCTTGTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACC	360
CMV-GB	301	-----C-----	360
CMV-YQ	361	GTGTGGGTGACAGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCCTCGGACTTGTCCGTGCGCCGACATCTCT	420
CMV-GB	361	-----T-----T-----C-----A-----T-----	420
CMV-YQ	421	GCTATGTTTGGCGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGGAGTC	480
CMV-GB	421	-----C-----C-----C-----C-----A-----	480
CMV-YQ	481	CAAGCCAACAATAAACTGTTGTATGATCTTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGCGACATG	540
CMV-GB	481	-----C-----T-----	540
CMV-YQ	541	CGTAAGTACGCCGTACTCGTGTATTCCAAGACGATGCACTCGAGACGGTAGAGCTAGTA	600
CMV-GB	541	---A-----T-----A-----T-----G---	600
CMV-YQ	601	CTTCATGTCGACATCGAGCACCAACGCATTCCACATCTGGGGTGCTCCCAAGTTTGA	657
CMV-GB	601	-----A-----	657

图 2 CMV-YQ 与 CMV-GB 分离物 CP 序列同源性比较

Fig. 2 Sequence comparison of coat protein genes of CMV-YQ and CMV-GB isolates

3 讨论

CMV 为雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (Cucumovirus) 的典型成员, 为单链正义 RNA 病毒, 主要通过蚜虫以非持久性方式传播, 还可通过机械接种或带毒种子进行传播。最常见的蚜虫介体是桃蚜 (*Myzus persicae*) 和棉蚜 (*Aphis gossypii*), 但 CMV 传播专化性较低, 目前认为 CMV 可以由 80 多种蚜虫传播^[11], 蚜虫在侵染植物上刺吸不到 1 min 即可获毒, 然后可迅速地传播到感病植物上。CMV 传播效率受蚜虫种类、毒源植物种类等多种因子影响, 本研究中桃蚜、萝卜蚜、棉蚜的传毒效率分别为 55%, 60%, 30%。在实践中, 蚜虫的成功传毒依赖于获毒、持毒、病毒稳定性、病毒释放等几个环节, 任意环节的变化均可能影响蚜传效率。

黄瓜花叶病毒株系众多, 不同株系的致病力和对寄主植物引起的症状也有很大差异。我们从番茄上分离到的黄瓜花叶病毒 CMV-YQ 分离物属于 CMV 亚组 I, 它使受感染的番茄叶呈线性化, 在三生烟上表现严重畸形、花叶症状。已有的研究表明, CMV 在寄主上的症状受环境条件等多种因素影响, 特别是 CMV 亚组 II 株系在三生烟上的症状及致病力受温度影响较大, 高温时症状易于潜隐, 而 CMV-

YQ 分离物在烟草上的致病力和症状受温度影响不大, 属于致病力较强的株系。

CMV-YQ 分离物与分离于我国芭蕉的另一亚组 I 分离物 GB 同源性为 94.37%, 而与 GenBank 上大多数茄科蔬菜上 CMV 亚组 I 分离物的同源性都高于 95%。所以, CMV 在不同种类的寄主上表现了一定的分化, 存在寄主适应性变异。CMV 番茄分离物 YQ 和芭蕉分离物 GB 变异的碱基以 C-T 之间的变异为主, 占变异碱基总数的 40.5%, 生物学意义尚待进一步明确。序列分析资料表明, 与亚组 II 成员相比较, 亚组 I 成员无论在编码区或非编码区的变异都较大^[12], 这种丰富的变异也许就是亚组 I 成员致病力、寄主范围、侵染症状等特性彼此相差很大的根本原因, 同时表明亚组 I 成员在自然界中的株系多样性比较丰富。本研究对 CMV 番茄蕨叶分离物 CP 基因的克隆和序列分析, 为今后对 CMV 的系统遗传学和进化研究提供了资料。

参考文献:

- [1] Edwardson J R, Christie R G. Cucumoviruses, CRC Handbook of viruses infecting legumes [M]. Boca Raton, Fla: CRC Press 1991: 293—319.
- [2] Peter Palukaitis, Fernando Gard a-Arenal. Cucumoviruses [J].

- Advances in Virus Research, 2003(62): 241—323.
- [3] Taliansky M E, Gareia Arensl F. Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant [J] . J Viro1, 1995, 69(2): 916—922.
- [4] Hideaki Nagano, Kazuyuki Mise, Iwao Funusawa, *et al.* Conversion in the Requirement of Coat Protein in Cell-to-Cell Movement Mediated by the Cucumber Mosaic Virus Movement Protein[J] . J Viro1, 2001, 75(17): 8045—8053.
- [5] Liu Sijun, He Xiaohua, Park G, *et al.* A conserved capsid protein surface domain of Cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission[J] . J Viro1, 2002, 76(19): 9756—9762.
- [6] 徐平东, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组研究进展[J] . 福建农业大学学报, 1998, 27(1): 82—91.
- [7] 李 凡, 周雪平, 戚益军, 等. 从云南烟草上检测到的黄瓜花叶病毒亚组 II 分离物[J] . 微生物学报, 2000, 40(4): 346—351.
- [8] 徐平东, 李 梅, 林奇英, 等. 黄瓜花叶病毒两亚组分离物寄主反应和血清学性质比较研究[J] . 植物病理学报, 1997, 27(4): 353—360.
- [9] 周雪平, 刘 勇, 李德葆. 从豆科植物上分离的黄瓜花叶病毒两株系外壳蛋白基因序列比较[J] . 浙江农业大学学报, 1998, 24(5): 556—561.
- [10] 徐平东, 周仲驹, 林奇英, 等. 黄瓜花叶病毒亚组 I 和 II 分离物外壳蛋白基因的序列分析与比较[J] . 病毒学报, 1999, 15(2): 164—171.
- [11] Donato Gallitelli. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agricultur[J] . Virus Research, 2000, 71(1/2): 9—21.
- [12] Roossinck M J, Lee Zhang, Hellwald K H. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups[J] . J Viro1, 1999, 73(8): 6752—6758.

《华北农学报》征订启事

《华北农学报》于 1986 年创刊, 由河北、北京、天津、山西、河南、内蒙古六省市区农科院和农学会联合主办的大农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

本刊为中国科学引文数据库核心期刊、全国综合性农业核心期刊、中国自然科学核心期刊及中国农业核心期刊。曾荣获全国优秀科技期刊三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、全国农口学会优秀期刊奖、华北优秀科技期刊奖及河北省优秀期刊奖。

国内外公开发行, 国内统一刊号: CN13—1101/S, 国际刊号 ISSN 1000—7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 192 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18—10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 邮失可补。请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编, 以免误投或无法投递。欢迎订阅、欢迎投稿。

通信地址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮编: 050051

电话: 0311—87652166

E-mail: hbnxb@163.com 或 hbnxb@sohu.com