

侵染广东辣椒的黄瓜花叶病毒的 CP 及 2b 基因序列分析

许东林, 周国辉, 宋晓兵

(华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 对侵染广东省阳西县田间辣椒的黄瓜花叶病毒 (*cucumber mosaic virus* CMV) 的 CP 及 2b 基因进行序列分析, 结果表明其 CP 基因与 CMV 亚组 I 亚组 II 各株系之间的核苷酸同源率分别为 90.9% ~ 93.8% 和 76.1% ~ 76.9%, 氨基酸同源率分别为 92.7% ~ 97.7% 和 72.4% ~ 78.1%; 其 2b 基因与 CMV 亚组 I 亚组 II 之间的核苷酸同源率分别为 83.9% ~ 90.2% 和 64.0% ~ 67.7%, 氨基酸同源率分别为 79.3% ~ 85.7% 和 50.5% ~ 53.5%。由此确认该 CMV 分离物属于亚组 I 成员。此外, CMV 亚组 I 成员的 CP 及 2b 基因中分别具有一段长为 102 bp 及 54 bp 的高度保守序列, 这为转基因诱导寄主转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing PTGS) 抗 CMV 育种研究提供了参考。

关键词: 辣椒; 黄瓜花叶病毒; CP 基因; 2b 基因; 序列分析

中图分类号: S435.121.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2006) 01-0051-04

Sequencing of CP and 2b Gene of *Cucumber Mosaic Virus* Infecting Pepper in Guangdong Province

XU Dong lin ZHOU Guo hui SONG Xiao bing

(Lab of Plant Virology South China Agric Univ, Guangzhou 510642 China)

Abstract The *cucumber mosaic virus* (CMV) infecting pepper in Yangxi county, Guangdong Province (CMV-gd) was confirmed as a subgroup I member by sequencing its coat protein (CP) gene and 2b gene. The results showed that CMV-gd shared CP gene nucleotide identities of 90.9%-93.8% and 76.1%-76.9% (deduced amino acid identities of 92.7%-97.7% and 72.4%-78.1%) compared with some CMV strains of subgroup I and II respectively, while 2b gene nucleotide identities of 83.9%-90.2% and 64.0%-67.7% (deduced amino acid identities of 79.3%-85.7% and 50.5%-53.5%) respectively. Furthermore, a 102 bp highly conserved sequence in CP gene and 54 bp in 2b gene of CMV subgroup I member were found. It was suggested that they would provide useful information for the anti-CMV strategy via transgene-induced plant post transcriptional gene silencing (PTGS).

Key words pepper; *cucumber mosaic virus*; CP gene; 2b gene; sequencing

黄瓜花叶病毒 (*cucumber mosaic virus*, CMV) 是流行分布和寄主范围最广泛、造成危害和经济损失最严重的植物病毒之一, 能侵染一千多种单、双子叶植物, 可由数十种蚜虫进行传播^[1-3]。目前有效防治 CMV 所致病害的主要方法是培育和利用抗病品种,

但在辣椒种质资源中, 抗 CMV 的育种材料很少, 因此许多研究试图采用基因工程技术培育抗性材料, 目前已有不少成功的报道^[1-6]。为了在广东省开展辣椒抗病毒育种工作, 笔者对广东省辣椒主产区阳西县大田中侵染辣椒的 CMV 的分子生物学进行了

收稿日期: 2005-03-26

作者简介: 许东林 (1982), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 周国辉 (1963), 男, 副教授, 博士, E-mail: ghzhou@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (E04025)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

初步研究, 本文报道病毒 CP 及 2b 基因序列分析结果.

1 材料与方法

1.1 病害样品采集与叶组织总 RNA 抽提

2004 年 4 月, 从广东省阳西县采集表现花叶症状的辣椒 (品种: 茂丰 3 号) 病株叶片. 剪取病叶组织 100 mg 在液氮下研磨成粉状, 采用华美 (洛阳) 生物工程公司的总 RNA 抽提试剂盒 (I), 按其说明书所示方法, 抽提叶组织总 RNA. 抽提产物溶解于 100 μ L 无 RNA 酶污染的双蒸水中, -20°C 保存备用. 以健康无症植株叶组织为阴性对照.

1.2 RT-PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 已报道的 CMV 基因组序列, 在其外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因两侧设计特异引物对 P_1 : 5'-TGGATGCTTCTCCGCGAGAT-3', P_2 : 5'-ATAGCAGAACTGCCAACTCA-3', 预期扩增片段大小为 817 bp. 在其 2b 基因两侧设计特异引物对 P_3 : 5'-TTCAGATCGTCGTCAGAGCG-3', P_4 : 5'-CGTTAGCTG-GATGGACAACC-3', 预期扩增产物片段大小为 549 bp. 上述 2 对引物的合成由上海博亚生物工程公司完成.

1.3 一步 RT-PCR 扩增

采用宝 (大连) 生物工程有限公司的 one step RNA PCR kit (AMV) 进行. 15 μ L 反应体系为: 总 RNA 溶液 1 μ L, 10 $\times$ reaction buffer 1.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.3 μ L, AMV-Optimized Taq 0.3 μ L, AMV RTase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 以无 RNA 酶污染的双蒸水补足 15 μ L. 一步 RT-PCR 的程序为: 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min; 52 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min.

1.4 扩增产物回收、克隆及序列测定

RT-PCR 扩增产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭) 电泳, UVP 凝胶成像系统观察和照相, 根据相对分子质量大小判断目的片段. 采用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 切胶回收目的 DNA 分子, 克隆于 pMD 18-T 载体, 由上海博亚生物工程公司采用双脱氧链末端终止法对重组质粒进行测序.

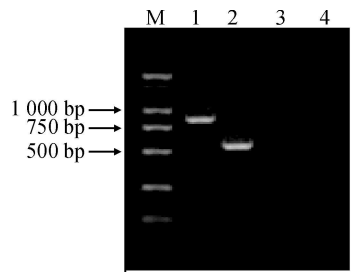
1.5 辣椒 CMV CP 及 2b 基因序列分析

在 GenBank 中对测序结果进行 blast 比对, 判断其是否为目的序列. 应用 DNA Star 5.01 软件包中的

MegA 软件求算 CP 及 2b 基因核苷酸序列以及其推导的蛋白氨基酸序列的同源率, 分析 CMV 广东阳西县辣椒分离物 (代号: CMV-gd) 与目前已报道的 CMV 若干代表株系之间的亲缘关系, 明确其所属亚组, 并在该亚组 CMV 各成员的 CP 和 2b 基因序列中搜索高度保守的区段.

2 结果与分析

以广东阳西县辣椒病叶总 RNA 为模板, 经引物对 P_1 - P_2 、 P_3 - P_4 进行 RT-PCR 扩增, 均可获得预期大小的产物 (图 1).



M: DNA marker; 1: 病样经 P_1 - P_2 扩增结果; 2: 病样经 P_3 - P_4 扩增结果; 3: 健康样品经 P_1 - P_2 扩增结果; 4: 健康样品经 P_3 - P_4 扩增结果

M: DNA marker; 1: amplification by P_1 - P_2 with diseased sample; 2: amplification by P_3 - P_4 with diseased sample; 3: amplification by P_1 - P_2 with healthy sample; 4: amplification by P_3 - P_4 with healthy sample

图 1 侵染阳西县辣椒的 CMV 的 CP 和 2b 基因片段扩增结果
Fig 1 RT-PCR amplification of CP and 2b gene of CMV infecting peppers from Yangxi county

测序结果表明, P_1 - P_2 的产物序列 (GenBank 登录号为 AY965892) 中包含长为 657 bp 的 CMV CP 基因, P_3 - P_4 的产物序列 (GenBank 登录号为 AY965891) 中包含长为 336 bp 的 CMV 2b 基因.

将 CMV-gd 的 CP 基因及 2b 基因序列与其他 CMV 分离物进行同源率比较 (表 1), 显示 CMV-gd 的 CP 基因和 CMV 亚组 I 各株系 CP 基因之间的核苷酸同源率为 90.9% ~ 93.8%, 推导氨基酸的同源率为 92.7% ~ 97.7%; 与亚组 II 各株系 CP 基因之间的核苷酸同源率为 76.1% ~ 76.9%, 推导氨基酸的同源率为 72.4% ~ 78.1%. 而 CMV-gd 的 2b 基因与 CMV 亚组 I 各株系 2b 基因之间的核苷酸同源率为 83.9% ~ 90.2%, 推导的氨基酸同源率为 79.3% ~ 85.7%; 与亚组 II 各株系 2b 基因之间的核苷酸同源率为 64.0% ~ 67.7%, 推导氨基酸的同源率为 50.5% ~ 53.5%. 此外, CMV CP 及 2b 基因亲缘关系分析 (图 2) 也揭示 CMV-gd 与亚组 I 各成员关系较近, 而与亚组 II 各成员的关系较远. 由此, 确认 CMV-gd 属于亚组 I 成员.

表 1 CMV- gd CP基因及 2b基因核苷酸序列及推导氨基酸序列与部分 CMV 株系的同源性比较

Tab. 1 Identities of CP and 2b gene nucleotide sequences and deduced amino acid sequences between CMV- gd and some CMV strains

CP 基因 CP gene				2b 基因 2b gene			
亚组	株系 ¹⁾	核苷酸同源率	氨基酸同源率	亚组	株系 ¹⁾	核苷酸同源率	氨基酸同源率
subgroup	strain	nucleotide identity %	amino acid identity %	subgroup	strain	nucleotide identity %	amino acid identity %
I	A s(X 77855)	93.0	96.8	I	A s(A F033667)	89.9	85.7
	AB I(L36525)	93.0	96.8		B(U 59740)	84.4	80.2
	B2(AB069971)	93.6	96.8		Ca(AY 429433)	88.7	83.0
	C(D00462)	92.5	95.4		D8(AB179765)	89.3	85.7
	Ca(AY 429432)	92.7	96.8		Fny(D00355)	85.0	81.1
	CS(D28489)	92.8	96.3		Ko ra(U 20218)	89.9	84.7
	Fny(U 20668)	93.0	96.8		Ko r(U 66287)	85.3	81.1
	Ko r(L36251)	90.9	92.7		M B(AF150731)	90.2	84.8
	M f (AJ276481)	93.2	97.3		M B 8(D86613)	84.7	80.2
	NT9(D28780)	93.8	97.3		M f(A J276480)	83.9	79.5
	P(X89652)	93.2	96.8		NT9(D28779)	86.8	81.1
	R s(A J517802)	93.2	96.8		P ep o(AB124835)	84.1	79.3
	SD(AB008777)	93.8	97.7		PRC (AF314188)	89.9	84.8
	T fn(Y16926)	93.8	97.7		R f AB096214)	85.0	82.0
	Y(D12499)	92.7	95.9		R s(A J517801)	85.0	81.1
	Ko ra(U 20219)	93.6	96.3		SD(U86330)	89.6	84.8
II	Q(J02059)	76.9	72.4	II	T fn(Y16925)	86.8	81.1
	Sn(U 22822)	76.9	78.1		Y(D12538)	85.3	80.2
	Trk7(L15336)	76.1	76.7		A LS(AJ276588)	67.7	50.5
	WL(D00463)	76.7	78.1		Q (Z21863)	67.3	51.5
			TN(AB176848)		67.7	50.5	
			Trk7(AJ007934)		64.0	53.5	

1)比较所用的株系序列均来自 GenBank

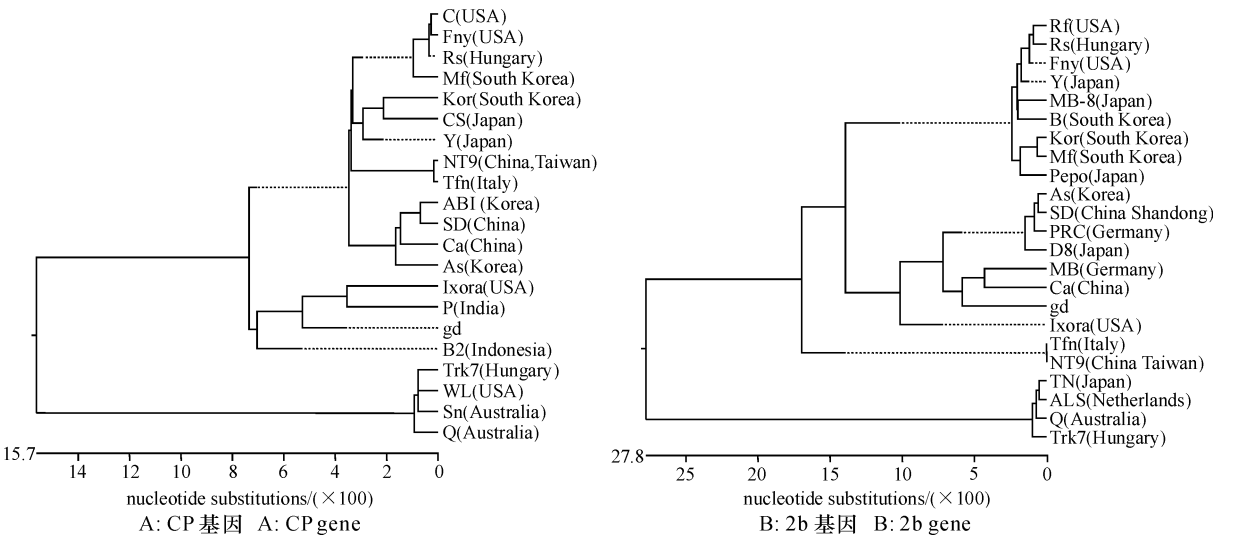


图 2 CMV CP基因 (A)及 2b基因 (B)的核苷酸序列进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of nucleotide sequences of the CP gene(A) and 2b gene(B) of some CMV strains

(+298 ~ +399)的高度保守序列(同源率>95%),占 CP 基因全长的 15.5%; 2b 基因中含有一段 54 bp (+96 ~ +149)的高度保守序列(同源率>90%),占 2b 基因全长的 16.1%.

3 讨论与结论

由于 CMV 基因组序列变异较大,株系繁多,分离自不同地区、不同寄主的 CMV 在生物学和分子生物学上均具很大差别^[2-7],使得抗 CMV 育种的难度大为增加,因此对病毒所属亚组进行鉴定是很有必要的. 本文通过 CP 基因及 2b 基因序列分析,明确广东阳西县侵染辣椒的 CMV 属于亚组 I 的成员,对该地辣椒抗病毒育种工作具有一定的指导意义.

通过将 CP 基因导入植物基因组内以介导植物对 CMV 的抗性,这在目前已有很多成功的例子,且所获抗性亦较理想^[1-4,6,8],但也存在一些缺点,例如高浓度的入侵病毒可能会克服由 CP 基因介导的抗性^[8],植物体内 CP 转基因的表达产物可能对入侵病毒进行“异源包装”以致改变其蚜传特性与寄主范围^[9],以及由于 CP 转基因与入侵病毒基因组之间的重组,有可能使病毒变异为致病力更强的“新毒株”^[10]等. 为了克服以上不足,人们期望通过激活植物对病毒的转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing PTGS)机制的方法来实现寄主对病毒的抗性^[11],即把基于病毒某个(些)基因序列而构建的、能够产生发夹状 RNA(hpRNA)的、具有反向重复结构的 DNA 片段导入寄主基因组内,一旦有病毒入侵, hpRNA 将激活植物 PTGS 机制,使病毒基因发生沉默.

诱导 PTGS 抗病性所用的转基因序列片段可以短至数十 bp 一般在 200 bp 左右即可起到良好的效果. 该序列不需要是完整的 ORF,即不要求具有编码蛋白的能力,因而较为安全;但该序列必须与靶病毒的相应序列高度同源^[12],因此,应当针对病毒最保守的基因组片段来构建具有反向重复序列的转基因片段,以获得对病毒众多变异体均具稳定抗病性的转基因育种材料. 本文分析发现,CMV 亚组 I 成员的 CP 基因和 2b 基因中分别含有一段长为 102 bp 和 54 bp 的高度保守序列,为辣椒抗 CMV 育种的后续工作提供了重要的参考信息.

CMV 的 2b 基因是一种基因沉默抑制子,其编码的 2b 蛋白对寄主的 PTGS 机制具有强烈的抑制作用,在病毒-寄主相互作用研究以及转基因抗病毒植物育种研究中具有重要意义^[13-14]. 通过转基因诱导 PTGS 使 CMV 2b 基因发生沉默,使寄主重新获得对

病毒(包括 CMV 以外的其他病毒)的 PTGS 机制,对辣椒抗病毒育种具有重要意义. 相关研究正在进行中.

参考文献:

[1] 覃瑞,程旺元. 黄瓜花叶病毒研究进展[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2004 23(2): 33-37.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 徐秉良,高鸿生,王旭. 黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒在双抗转基因线辣椒内的繁殖[J]. 中国病毒学, 2002 17(3): 243-247.

[5] 李华平,胡晋生,王敏,等. 黄瓜花叶病毒衣壳病毒基因转化辣椒研究[J]. 病毒学报, 2000 16(3): 276-278.

[6] 徐平东,李梅,林奇英. 我国黄瓜花叶病毒及其病害研究进展[C]//植物病毒学会. 第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学术讨论会论文集. 北京: 农业科技出版社, 1997 13-22.

[7] 李华平,胡晋生,范怀忠. 黄瓜花叶病毒亚组研究进展[J]. 中国病毒学, 1994 9(3): 187-194.

[8] 李爱民,薛林宝,张永泰,等. 黄瓜花叶病毒病防治策略研究进展[J]. 长江蔬菜, 2004 3: 38-42.

[9] AAZZ R, TEPFER M. Recombination in RNA viruses and in virus resistant transgenic plant[J]. J Gen Virol, 1999 80 1 339-1 346.

[10] 雷万里,方荣祥,张国华,等. 黄瓜花叶病毒互补型载体可与 CP 转基因发生重组[J]. 中国科学: C 辑, 2001 31(2): 97-105.

[11] ROVER C V, VAS M, HOPP H E. RNA-mediated virus resistance[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002 13: 167-172.

[12] KALANTIDIS K, PSARADAKIS S, TABLER M, et al. The occurrence of CMV-specific short RNA s in transgenic tobacco expressing virus induced double stranded RNA is indicative of resistance to the virus[J]. MPMI 2002 15(8): 826-833.

[13] 庄木,王晓武,谢丙炎,等. 我国不同 CMV 分离物 2b 基因片段的 RT-PCR 扩增及其序列比较[J]. 植物病理学报, 2003 33(2): 146-150.

[14] BRIENETIG, VO NNETQ, LIW X, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotina benthamiana* [J]. The EMBO J 1998 17(22): 6 739-6 746.

【责任编辑 周志红】