

鲁粤两省黄瓜花叶病毒辣椒分离物 CP基因序列分析及亚组鉴定

孙秀东¹, 周淑梅², 雷建军³, 曹必好³, 陈国菊³

(1 山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018; 2 山东农业大学 生命科学院,
山东 泰安 271018; 3 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:从广东和山东呈现花叶病症的辣椒上分离纯化得到2个黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 的分离物. 利用 RT-PCR 技术克隆了病毒分离物的外壳蛋白 (CP) 基因. 核苷酸序列测定表明, CMV-GDLJ 和 CMV-SDLJ 2 个病毒分离物 CP 基因序列长度为 657bp, 编码 218 个氨基酸. 2 个病毒分离物的 CP 基因序列与 CMV 亚组 I 的 6 个株系 CP 基因序列同源性均在 90% 以上, 而与亚组 II 的 3 个株系同源性均低于 80%, 据此将分离物 CMV-GD 和 CMV-TA 归属于 CMV 亚组 I.

关键词: 辣椒; 黄瓜花叶病毒; 亚组 I; CP 基因; 序列分析

中图分类号:S436.418.12

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)01-0110-03

Sequence Analysis of CP Gene and Subgroup Identification of CMV from Pepper in Guangdong and Shandong

SUN Xiu-dong¹, ZHOU Shu-mei², LEI Jian-jun³, CAO Bi-hao³, CHEN Guo-ju³

(1 College of Horticulture Science and Engineering, Agricultural University of Shandong, Taian 271018, China;
2 College of Life Sciences, Agricultural University of Shandong, Taian 271018, China;
3 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two CMV isolates were obtained from the pepper with mosaic symptom in Guangdong and Shandong. The coat protein (CP) gene of the isolates was cloned by using RT-PCR technology. Sequencing results showed that the CP gene of the isolate had 657bp, encoding 218 amino acids. Comparison of the CP gene nucleotide sequences indicated that the CP gene nucleotide sequences of the isolate shared over 90% of homology with that of 6 strains belonging to CMV subgroup I, but less than 80% with 3 strains of subgroup II. Based on the homology, it was concluded that the two isolates belong to subgroup I.

Key words: pepper; CMV; subgroup I; CP gene, sequence analysis

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 为雀麦花叶病毒科 Bromoviridae 黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus* 的典型成员, 能侵染 85 科的 1 000 多种植物, 因为其发生的普遍性和所引起病害的严重性, 已成为农业生产上危害最为严重的植物病毒之一^[1]. 根据

寄主范围、血清学关系、外壳蛋白 (CP) 和核酸序列分析等将 CMV 株系或分离物划分为 CMV 亚组 I 和 CMV 亚组 II^[2,3]. 核酸序列分析被认为是区分 CMV 亚组最灵敏、最可靠的方法, 已越来越多地应用于 CMV 亚组的划分. 迄今已报道或 GenBank 登陆的已

收稿日期:2007-11-25

作者简介: 孙秀东(1977—), 男, 讲师, 硕士; 通讯作者: 雷建军(1957—), 男, 教授, E-mail: jjlei@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技攻关项目(2006B20201028); 广州市攻关项目(2005Z2-E0071); 广东省农业厅项目

有至少 20 个 CMV 基因组全序列和 270 个 CP 基因序列。我国也先后从十字花科、茄科、百合科及葫芦科等多种植物上分离得到 CMV 并测定了其 CP 基因序列,众多研究显示,侵染我国植物的 CMV 以亚组 I 为主^[4-7]。广东和山东是我国辣椒生产大省,近年来随着栽培面积的不断扩大,病毒病害日益加重,为此开展了辣椒病毒病研究。本研究采用 RT-PCR 技术,对分离自辣椒的 2 个 CMV 分离物的 CP 基因进行了克隆,并通过序列分析和同源性比较,确定了其归属地位,为抗病毒育种及 CP 基因介导抗病毒辣椒研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 毒源及试剂

广东省毒源于 2005 年 3 月采自广州郊区蔬菜地;山东省毒源于 2005 年 7 月采自山东农业大学园艺学院蔬菜实验场,均从呈现花叶病症的辣椒病株上获得。

样品经苋色黎 3 次单斑分离纯化、生物学和血清学检测,鉴定其为 CMV,分别命名为 CMV-GDLJ 和 CMV-SDLJ,繁殖保存于心叶烟。

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、*Taq*DNA 聚合酶、dNTPs、 λ DNA *Eco*R I + *Hind* III Marker 购于上海生工公司,其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病毒总核酸的提取和 RT-PCR 病毒 RNA 的提取和纯化按照试剂盒的说明进行。用于 RT-PCR 扩增的引物为文献[9]报道的引物,序列为: 5'-AT-GGACAAATCTGAATCAACC-3'(5' 端引物); 5'-TA-AGCTGGATGGACAACCCGT-3'(3' 端引物)。取病毒 RNA 提取液 1 μ L,采用反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。以 cDNA 为模板,建立以下 PCR 反应体系: 25 μ L PCR 反应体系中,10 mmol/L dNTP 混合物 0.5 μ L,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ L,20 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L,模板 1 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。

1.2.2 PCR 产物纯化、序列分析及同源性比较

PCR 产物经 DNA 回收试剂盒回收纯化,纯化产物连接至克隆载体 pMD18-T 并转化大肠杆菌 DH5 α ,经 PCR 鉴定及 *Eco*R I 酶切鉴定重组质粒,选出含有正确插入片段的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司

进行序列测定。

采用 DNAstar 中 MegAlign 软件的 ClustalW 方法,将 CMV-GDLJ 和 CMV-SDLJ 的 CP 基因与已发表的 10 个 CMV 分离物的 CP 基因进行序列同源性分析,构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物,结果均扩增出约 780 bp 预期目的片段,没有其他非特异性的 DNA 条带。

2.2 CP 基因序列分析与同源性比较

测序结果表明,2 个分离物的 CP 基因序列长度为 657 bp,含 1 个开放性阅读框,编码 218 个氨基酸。将分离物 CMV-GDLJ (GenBank 登录号为 FJ403474) 和 CMV-SDLJ (GenBank 登录号为 FJ403473) 的 CP 基因核苷酸序列与其他 CMV 株系或分离物的 CP 基因核苷酸序列进行同源性比较,结果见表 1。表 1 显示,分离物 CMV-GDLJ 和 CMV-SDLJ 的 CP 基因与 CMV 亚组 I 的株系或分离物的 CP 基因同源性在 90% 以上,与 CMV 亚组 II 的株系或分离物的 CP 基因同源性在 80% 以下。由此可知,分离物 CMV-GDLJ、CMV-SDLJ 与 CMV 亚组 I 具有密切的同源关系。

表 1 鲁粤两省黄瓜花叶病毒分离物与 CMV 两亚组中各株系 CP 基因的核苷酸序列的同源性比较

Tab. 1 Nucleotide sequence homology of CP gene among CMV-GDLJ, CMV-SDLJ and other CMV strain of subgroup I and subgroup II

亚组	株系	基因库登录号	同源性/%	
			CMV-GDLJ	CMV-SDLJ
亚组 I	SG15	AY560556	98.8	95.1
	WP122	AY861398	97.2	95.3
	BT	DQ302717	96.8	95.5
	Tiva4	AY861406	96.4	94.3
	ZJZC	AJ575589	94.8	95.2
	GF	DQ302719	94.6	96.7
亚组 II	Kin	Z12818	79.3	79.3
	WL	D00463	78.9	78.9
	Tobacco	U61285	77.6	78.5

利用 DNAstar 软件对分离物 CMV-GDLJ 和 CMV-SDLJ 与其他已发表的 10 个 CMV 株系(分离物)的 CP 基因核苷酸序列进行聚类分析,并绘制系统树,从图 1 中可以看出分离物 CMV-GDLJ 和 CMV-

SDLJ 属于 CMV 亚组 I, CMV-GDLJ 与泰国辣椒分离物 SG15 亲源关系最近, CMV-SDLJ 与番茄上的分离物 GF 同源性最高。

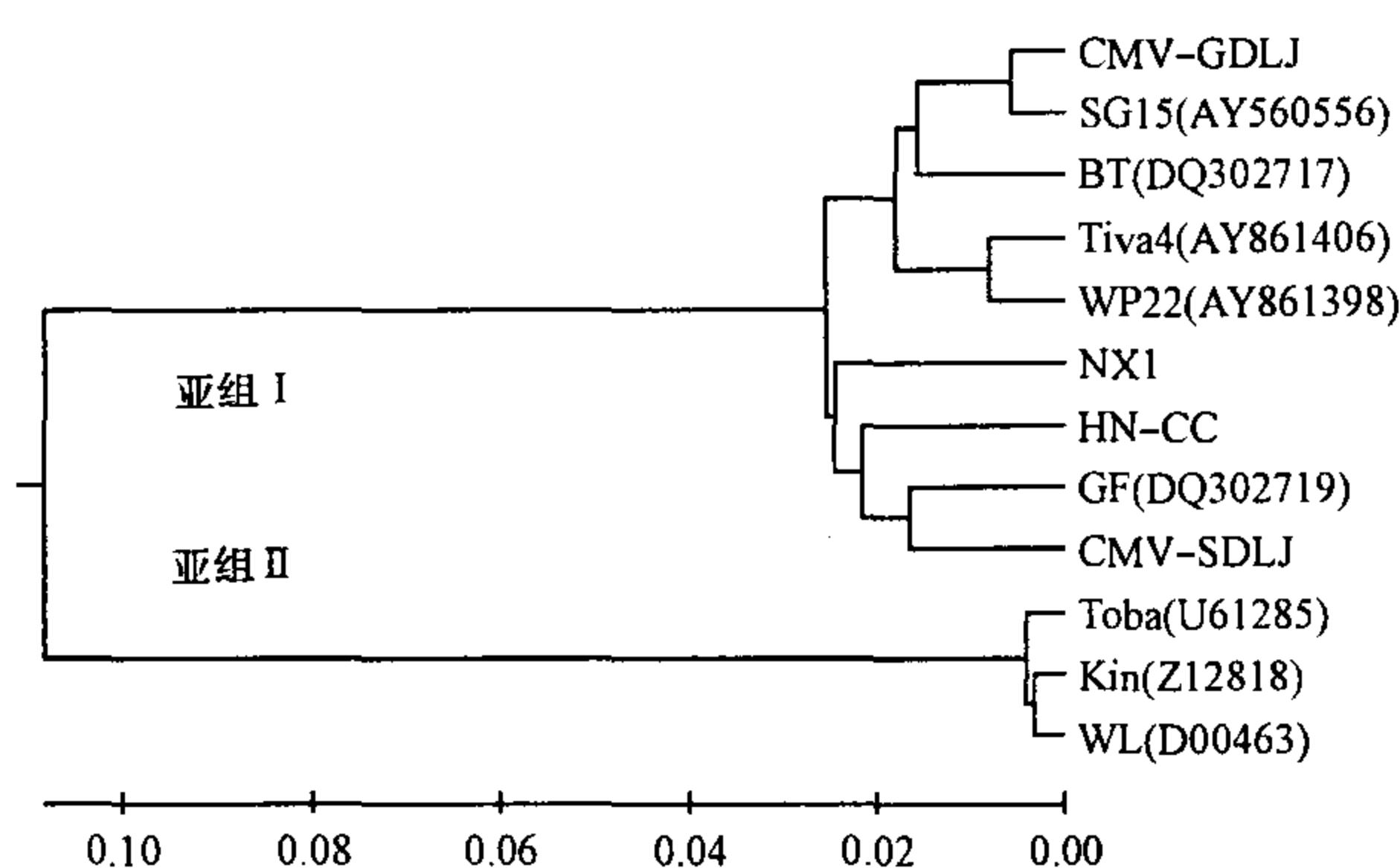


图 1 基于 CP 基因序列构建的分离物 CMV-GDLJ 及 CMV-SDLJ 与其他株系的系统树

Fig. 1 Homology tree by the average linkage clustering for the coat protein gene sequence

3 讨论

近年来, CMV 的株系分类是根据核苷酸序列分析,结合寄主反应、血清学关系等来进行的,并将 CMV 株系或分离物划分为 CMV 亚组 I 和 CMV 亚组 II。CMV 株系繁多,不同的株系致病力各异,对 CMV 进行亚组鉴定,可为有效防治 CMV 引致的病害提供依据^[8]。关于侵染我国辣(甜)椒的 CMV, 许东林等^[9]报道了广东阳西县辣椒上的 1 个 CMV 分离物, CP 基因与 CMV 亚组 I 各株系之间的核苷酸同源率为 90.9% ~ 93.8%, 被归于亚组 I。王健华等^[10]也报道了侵染海南辣椒的 1 个 CMV 分离物, 根据 CP 基因序列绘制的进化树中与亚组 I 的来自海南西番莲的 Pf 株系亲缘关系最近, 被归为亚组 I。陈伟等^[11]通过 RT-PCR 的方法对来自北京甜椒的 1 个分离物 CP 基因进行扩增, 结果表明这 1 个分离物属于亚组 I。本研究比较分析了分离物 CMV-GDLJ、CMV-SDLJ 与其他已发表的 CMV 株系的 CP 基因核苷酸序列的同源性, 结果表明该分离物与国内外已报道的 CMV 亚组 I 的 6 个分离物或株系具有较高的同源性, 同源性在 90% 以上; 而与已报道的 CMV 亚组 II 的 3 个分离物的同源性较低, 同源性在 80% 以下。因此将分离物 CMV-GDLJ、CMV-SDLJ 归属于 CMV

亚组 I。这一研究结果, 为广东和山东两省 CMV 的株系分化研究提供了分子生物学的依据, 也为辣椒抗病毒育种及 CP 基因介导的辣椒抗病毒研究奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] PALUKAITIS P, ROOSSINEK M J, DIETZGEN R G. *Cucumber mosaic virus* [J]. Advances in Virus Research, 1992, 41: 281-346.
- [2] HIDEAKI N, KAZUYUKI M, IWAO F S, et al. Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the *Cucumber mosaic virus* movement protein [J]. J Virol, 2001, 75(17): 8045-8053.
- [3] WAHYUNI W S, DIETZGEN R G. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus* [J]. Plant Pathology, 1992, 41(4): 282-297.
- [4] 赵丹, 孔宝华, 李凡, 等. 侵染百合的黄瓜花叶病毒亚组 II 分离物 CP 基因克隆和序列分析 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(5): 456-460.
- [5] 席德惠, 林宏辉, 向本春. 黄瓜花叶病毒 2 个分离物的亚组鉴定及株系分化研究 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 232-237.
- [6] 李志勇, 夏惠娟, 李兴红, 等. 北京、宁夏甜椒上分离的黄瓜花叶病毒 CP 基因序列分析及亚组鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 89-92.
- [7] 田兆丰, 裴季燕, 刘伟成, 等. 我国部分省市甜椒黄瓜花叶病毒的亚组鉴定 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 190-192.
- [8] 徐平东, 周仲驹, 林齐英. 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.
- [9] 许东林, 周国辉, 宋晓兵. 侵染广东辣椒的黄瓜花叶病毒的 CP 及 2b 基因序列分析 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1): 51-54.
- [10] 王健华, 刘志昕, 王运勤, 等. 海南黄灯笼辣椒顶死病病原病毒的分离鉴定 [J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 99-101.
- [11] 陈伟, 罗静, 庄木, 等. 部分蔬菜 CMV 分离物 CP 基因的克隆及序列分析 [J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1011-1014.

【责任编辑 周志红】