植物保护学报 Journal of Plant Protection，2018，45(3)：647-648　　DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2016214

甜瓜坏死斑点病毒广西分离物近全基因组序列克隆及分析

Cloning and sequence analysis of the nearly complete genome of *Melon necrotic spot virus* Guangxi isolate

李战彪[1]　杨世安[1,2]　谢慧婷[1]　秦碧霞[1*]　崔丽贤[1]　蔡健和[1*]

（1. 广西农业科学院植物保护研究所，广西作物病虫害生物学重点实验室，南宁 530007；2. 广西大学农学院，南宁 530004）

Li Zhanbiao[1]　Yang Shi'an[1,2]　Xie Huiting[1]　Qin Bixia[1*]　Cui Lixian[1]　Cai Jianhe[1*]

（1. Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Research Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China）

甜瓜坏死斑点病由甜瓜坏死斑点病毒（*Melon necrotic spot virus*，MNSV）引起，最早报道于日本（Kishi，1966），中国于2008年首次在江苏省海门市的甜瓜上发现，随后在山东省寿光、泰安等市陆续被报道，严重影响瓜类的品质与质量。吴会杰和古勤生（2017）分析了MNSV-HM和MNSV-Shangdong甜瓜分离物基因组，进化分析结果显示二者亲缘关系较近，可能具有相同来源。近年来，广西壮族自治区甜瓜生产发展较快，病毒病发生有逐年加重之势，因此本研究对MNSV广西分离物近全长基因组进行克隆分析，阐述其进化关系，以期为明确该地区甜瓜病毒病的发生规律及MNSV的致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品：疑似甜瓜坏死斑点病毒甜瓜病样和健康甜瓜叶片均采自南宁市，-80℃保存备用。

试剂及仪器：TRNzol总RNA提取试剂，天根生化科技（北京）有限公司；PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit、DNA片段纯化试剂盒、pMD19-T连接载体、大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α感受态细胞、质粒提取试剂盒，宝生物工程（大连）有限公司；其它生化试剂均为国产分析纯。TP350 PCR仪，宝生物工程（大连）有限公司。

1.2 方法

称取甜瓜病叶、健康叶片各100 mg，参照TRNzol总RNA提取试剂说明提取总RNA。根据GenBank数据库已报道的MNSV基因序列（M29671、GU480022等），分别设计1对检测引物（MNSV-F：5′-GGAGGCAACATTTCGTACA-3′，MNSV-R：5′-AGAGACCAAGCGATCAAAC-3′）及4对扩增近全长基因组引物（MNSV-1F：5′-ACTGTCGTGGATTACTCTAGCCG-3′，MNSV-1R：5′-GCGCCTCCTGCCAGTATAGA-3′；MNSV-2F：5′-AAGAAGGAACTAGAGCCTGCCC-3′，MNSV-2R：5′-GATAAAAGCTAAAACGGGCGTC-3′；MNSV-3F：5′-ATCCGTGAACAGTTCTGGCATAC-3′，MNSV-3R：5′-TATAGGTGAAACGGAGCCGAGT-3′；MNSV-4F：5′-TCTTCCCGCAAATGATCTCAC-3′，MNSV-4R：5′-CATCTAATGGGCGGGATGG-3′）。引物委托上海立菲生物技术有限公司合成。

RT-PCR反应体系参照PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit试剂盒要求，依据各引物退火温度进行扩增。扩增产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。经胶回收试剂盒回收PCR产物，并分别克隆至pMD19-T载体，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，筛选的阳性克隆子经酶切验证后由上海立菲生物技术有限公司进行测序。利用Invitrogen VectorNTI 11.5软件对序列进行拼接及同源性分析；利用Simplot 3.5.1软件进行病毒基因组重组分析；利用MEGA 5.0软件以最大似然法构建系统进化树，用10 000步值检验进化树拓扑结构的可靠性。

2 结果与分析

2.1 MNSV-GX近全基因组序列的获得及分析

以4对特异引物进行RT-PCR扩增，获得4条大小为1 254、1 222、1 079、1 132 bp的片段，拼接、校正后获得近全长基因组序列4 333 bp，命名为MNSV-GX

基金项目：国家现代农业产业技术体系广西特色水果创新团队项目（nycytxgxcxtd-04-19-2），广西自然科学基金（2015GXNSFBA139075），河南省果树瓜类生物学重点实验室开放基金（HNS-201508-10）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：caijianhe@gxaas.net，Qinbx@126.com；收稿日期：2016-11-30

(GenBank 登录号KY264755)。BLASTn比对分析发现该分离物与GenBank中已报道的MNSV核苷酸相似性为87.0%~94.0%,证实MNSV-GX为MNSV的1个分离物。MNSV-GX各编码区与已报道MNSV各序列对应编码区差异不大,但3′非编码区的差异较大,核苷酸相似性仅为46.0%~74.9%,与MNSV-264(AY330700)、MNSV-Kochi(AB232926)和MNSV-Tottori(AB232925)的相似性最低,分别为46.0%、48.0%和48.7%。重组分析结果显示,MNSV-GX可能是由MNSV-N(KF060715)和南瓜蚜传黄化病毒(*Cucurbit aphid-borne yellows virus*,CABYV)(HQ439023)中间重组(3′非编码区)形成的新病毒株系。

2.2 MNSV-GX的进化分析

MNSV-GX与MNSV-264(AY330700)、MNSV-AI(DQ339157)、MNSV-ISR(DQ922807)、MNSV-PMNS17A(M29671)、MNSV-N(KF060715)和MNSV-HM(GU480022)等分离物聚在同一分支,但MNSV-GX单独处于一个独立的小分支;而来自日本的甜瓜分离物(AB250686、AB250685)以及西瓜分离物(AB232925、AB232926)分别处于不同分支(图1)。表明MNSV-GX与MNSV-HM等分离物的亲缘关系较近,与日本各分离物的亲缘关系较远。

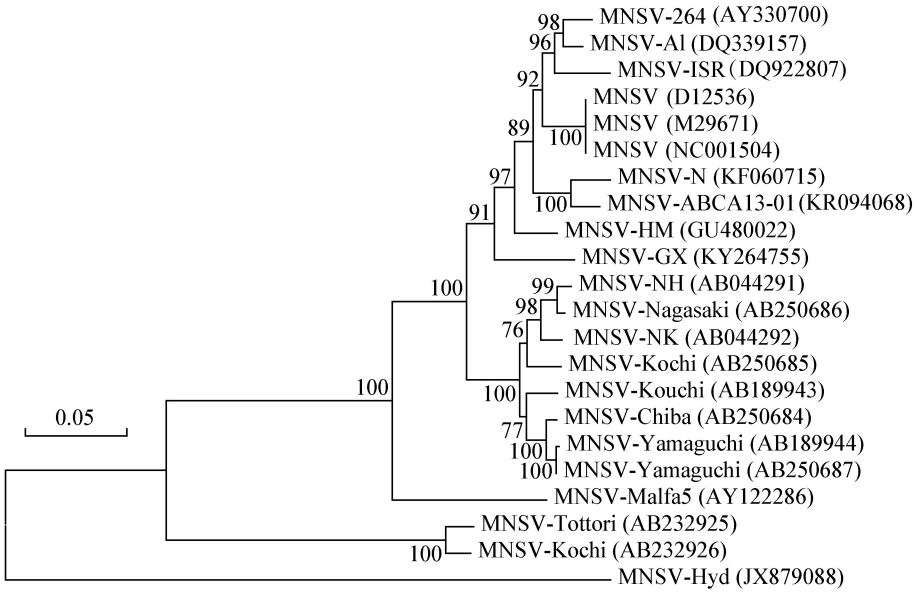

图1 基于MNSV近全基因组序列构建MNSV-GX及相关代表性分离物的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of MNSV-GX and other representative isolates based on the MNSV complete genome sequence

3 讨论

本研究获得了MNSV广西分离物的近全长基因组序列,并分析了其基因结构特征及进化关系,证实MNSV-GX为MNSV与CABYV种间自然重组形成的一个新病毒株系,其进化来源与国内已报道分离物不同,其为国内首次发现的MNSV重组病毒,是从其它省份传播至广西还是在本地完成的重组仍需进一步研究。病毒的3′编码区序列能够打破寄主的基因抗性(吴会杰和古勤生,2017),如Nieto et al.(2011)认为MNSV-264能够侵染MNSV的非寄主植物烟草及千日红,主要原因是MNSV-264的3′编码区序列不同;Miras et al.(2014)发现MNSV-N克服eIF4e介导的抗性主要因为其3′编码区存在一段来自CABYV的重组序列;本研究中MNSV-GX的3′编码区部分片段同样来自CABYV,推测其可能具有较宽的寄主范围,下一步将构建该分离物的侵染性克隆,完善相关工作。

参 考 文 献(References)

Kishi K. 1966. Necrotic spot of melon, a new virus disease. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 32(3): 138−144

Miras M, Sempere RN, Kraft JJ, Miller WN, Aranda MA, Truniger V. 2014. Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking. New Phytologist, 202(1): 233−246

Nieto C, Rodríguez-Moreno L, Rodríguez-Hernández AM, Aranda MA, Truniger V. 2011. Nicotiana benthamiana resistance to non-adapted *Melon necrotic spot virus* results from an incompatible interaction between virus RNA and translation initiation factor 4E. The Plant Journal, 66(3): 492−501

Wu HJ, Gu QS. 2017. The genome of *Melon necrotic spot virus* isolated in Shandong Province of China. Acta Phytopathologica Sinica, 47(2): 234−239 (in Chinese) [吴会杰, 古勤生. 2017. 甜瓜坏死斑点病毒山东分离物的基因组. 植物病理学报, 47(2): 234−239]

(责任编辑:李美娟)