

芜菁花叶病毒广东分离物的分子特征和序列分析

Molecular characteristics and sequence analysis of the complete genome of turnip mosaic virus isolates from Guangdong, China

汤亚飞 张丽 李正刚 蓝国兵 于琳 何自福 余小漫*

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

Tang Yafei Zhang Li Li Zhenggang Lan Guobing Yu Lin He Zifu She Xiaoman*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

芜菁花叶病毒(turnip mosaic virus, TuMV)是一种(+)ssRNA病毒,基因组全长约为10 kb,根据其基因组系统进化关系,可划分为basal-Brassica(basal-B)、basal-Brassica/Raphanus(basal-BR)、Asian-Brassica/Raphanus(Asian-BR)、world-Brassica(world-B)、Iranian和Orchis共6个组(Yasaka et al., 2017)。该病毒寄主范围广、危害大,至少能侵染43科156属300多种植物。目前,TuMV在我国大部分地区均有分布,已成为危害十字花科蔬菜的优势病毒。菜心 *Brassica parachinensis* 是广东省主要的十字花科蔬菜作物,病毒病发生严重,且TuMV是危害十字花科蔬菜作物的主要病毒。目前,在GenBank数据库中已登录的我国各地TuMV分离物基因组全长序列涉及山东省、辽宁省、北京市、浙江省和台湾省。本研究拟对TuMV广东分离物的基因组全长进行克隆与序列分析,明确其分子特征,以期为广东省菜心病毒病的及时检测和防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:于2018年12月从广东省广州市南沙区采集3份表现典型花叶症状的菜心病样,利用马铃薯Y病毒属Potyvirus病毒筒并引物Sprimer/PCR1进行RT-PCR检测及片段克隆测序,确定病样中存在TuMV,并于-80℃保存备用。

试剂及仪器:植物RNA提取试剂盒及大肠杆菌 *Escherichia coli* T1-1感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;反转录试剂盒、pMD20-T载体、Premix Taq DNA聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,美国Thermo Fisher公司;

其余试剂均为国产分析纯。T100梯度PCR仪、164-5050 PowerPac基础电泳仪、Gel Doc XR凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

引物设计与合成:利用引物Sprimer/PCR1从供试菜心病样扩增获得的病毒序列与TuMV-CN2J26(GenBank登录号:AB252106)相似性最高,命名为TuMV广东分离物(TuMV-GD)。根据TuMV-CN2J26基因组序列,设计7对引物1-F(5'-AAAAATAAAA-ACTCAACATAAC-3')/1-R(5'-GCTTTCTCAACTC-CATCGCTTATA-3')、2-F(5'-ATCTATGAAGCACAGGTTGACG-3')/2-R(5'-CTGCATTATCTGACCCATTAAATATTAGC-3')、3-F(5'-ATCAAGAGGCTCATAAAAGGAGT-3')/3-R(5'-GACAACCTGCTTGTGTA-CGTTTT-3')、4-F(5'-CAAAGACATATTGCTAATGGGAGC-3')/4-R(5'-ATCAGCATTTCAGCTTTCTAACT-3')、5-F(5'-GAGAAGGAAACAGGAGTACTTCA-3')/5-R(5'-AATTGATGGAGTTCTGGAAGTTT-3')、6-F(5'-AAAACAGTCAATTTTGGAAACACT-3')/6-R(5'-CGACATAAACCAAAGATCTCCTTT-3')和7-F(5'-CTAAGCGTACACCCAGAGTATGA-3')/7-R(5'-GTCCCTTGCATCCTATCAAATG-3')用于扩增TuMV-GD基因组全长序列。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

TuMV-GD基因组序列克隆及序列分析:取菜心病叶100 mg,用植物RNA提取试剂盒参照说明书提取其总RNA,沉淀溶解于40 μL DEPC处理的ddH₂O中。取5 μL总RNA为模板,利用反转录试剂盒用随机引物反转录合成cDNA,再利用7对引物分

别进行PCR扩增,分段获得TuMV-GD基因组序列。50 μL反应体系:反转录产物1 μL、PCR Mixer 25 μL、10 μmol/L上下游引物各2 μL、灭菌水20 μL。反应程序:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸2 min,35个循环;72℃再延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,应用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收PCR产物,纯化后克隆到pMD20-T载体,并转化大肠杆菌T1-1感受态细胞,随机挑取3个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用DNASTar软件的SeqMan程序对所得序列进行拼接,使用NCBI的ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框,采用BLAST程序进行相似性序列搜索并利用MegAlign程序以Clustal W方法进行核苷酸和氨基酸序列比对分析,采用MEGA 6.0软件以辣椒脉斑驳病毒(chilli veinal mottle virus, ChiVMV)为外组,通过邻接法构建系统进化树,Bootstrap值为1 000。

2 结果与分析

2.1 TuMV-GD基因组结构特征

对分段克隆所获序列进行拼接,获得TuMV-GD基因组全长序列,GenBank登录号为MT588113。除poly(A)尾外,TuMV-GD基因组序列长度为9 833 nt,含1个编码3 164个氨基酸的多聚蛋白,位于130~9 624 nt处,该多聚蛋白被水解酶酶切成PI、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、Nla-Vpg、Nla-pro、NIb和CP共10个成熟蛋白。5'-非编码区和3'-非编码区的长度分别为129 nt和209 nt,5'-非编码区包含ATAACAT和TCAAGCA高度保守序列区域,3'-末端含poly(A)尾。

2.2 TuMV-GD序列相似性分析

BLAST比对结果显示,与TuMV-GD基因组序列相似性较高的为各TuMV分离物序列。利用Clustal W方法进一步分析,发现TuMV-GD与来自basal-B、basal-BR、Asian-BR、world-B、Iranian和Orchis的33个TuMV分离物基因组的核苷酸序列相似性为77.3%~96.9%,其中与来自中国浙江省的TuMV-CNZJ26(登录号AB252106)相似性最高,为96.9%,与来自德国的TuMV-OM和TuMV-OS(登录号分别为AB701690和AB701693)相似性最低,为77.3%。TuMV-GD与33个分离物基因组编码的多聚蛋白氨基酸序列相似性为87.0%~98.2%,其中与来自中国浙江省的TuMV-CNZJ26(登录号AB252106)相似性最高,为98.2%。

2.3 TuMV-GD系统进化树分析

TuMV-GD与归属于world-B组的中国、美国、日本、肯尼亚、荷兰和巴西等国家的各TuMV分离物亲缘关系较近,聚在1个大分支上,其中与来自中国浙

江省的TuMV-CNZJ26(登录号AB252106)亲缘关系最近,聚在1个小分支,与其他5组的各TuMV分离物亲缘关系较远,其中与Orchis组的亲缘关系最远(图1)。

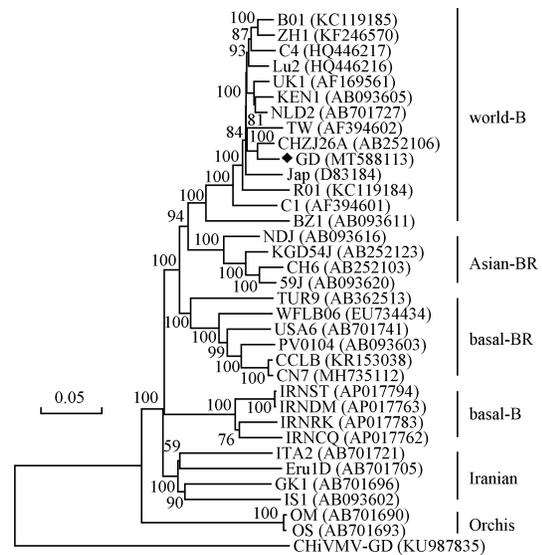


图1 基于病毒基因组全序列构建TuMV-GD与其他33个TuMV分离物的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the complete genome sequences of TuMV-GD and other 33 TuMV-isolates

3 讨论

目前已报道的TuMV中国各地分离物均属于world-B、basal-BR和Asian-BR组(熊艳等,2018)。本研究首次获得TuMV广东分离物基因组全长序列,并根据病毒序列的相似性和系统进化分析明确其属于world-B组。该结果丰富了我国TuMV分离物种群信息,为开展该病毒种群遗传特征、序列变异与进化等研究提供了素材。但由于本研究仅对分离自广东省菜心的TuMV分离物基因组全长序列进行了分析,仅能说明world-B组分离物在广东省有分布,不能证明该地区不存在其他组分离物。因此,后续需要进一步扩大样品来源,对来自不同地点、寄主、时间的病毒分离物进行基因组特征分析。

参考文献 (References)

- Yasaka R, Fukagawa H, Ikematsu M, Soda H, Korkmaz S, Golnaraghi A, Katis N, Ho SYW, Gibbs AJ, Ohshima K. 2017. The timescale of emergence and spread of turnip mosaic potyvirus. *Scientific Reports*, 7(1): 4240
- Xiong Y, Sun M, Xiang HF, Wang HB, Zhang HC, Qing L. 2018. Detection and sequence analysis of CP gene of Turnip mosaic virus (TuMV) infecting radish plants in Chongqing City. *Journal of Plant Protection*, 45(3): 432-438 (in Chinese) [熊艳, 孙森, 向华丰, 王鹤冰, 张洪成, 青玲. 2018. 重庆市萝卜芜菁花叶病毒的检测与序列分析. *植物保护学报*, 45(3): 432-438]

(责任编辑:李美娟)