

滇黑两省黄瓜花叶病毒南瓜分离物外壳蛋白基因序列分析

杨国慧² 张仲凯¹ 崔崇士^{2*}

(¹云南省农业生物技术重点实验室, 云南昆明 650223; ²东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 利用免疫捕捉多聚酶链式反应 (Immuno-Capture PCR, IC-PCR) 方法从南瓜的两个黄瓜花叶病毒 (*Cucurbit mosaic virus*, CMV) 云南分离物 (CMV-YN) 和黑龙江分离物 (CMV-HLJ) 中扩增获得约 700 bp 的外壳蛋白 (Coat protein, CP) 基因片段, 并克隆到 pGEM-T 载体中。核苷酸序列测定表明, CMV-HLJ 和 CMV-YN 两个分离物 CP 基因长为 657 bp, 编码 219 个氨基酸, 两个分离物的核苷酸和氨基酸同源性分别达到 96.8% 和 97.4%。和国外 CMV 亚组 6 个分离物核苷酸序列同源性在 90% 以上, 氨基酸同源性在 97% 以上, 和亚组 6 个分离物的同源性分别为 66.4% 和 73.4%。和国内亚组 10 个分离物的核苷酸同源性都在 89.5% 以上, 氨基酸同源性在 93% 以上, 而和亚组 两个分离物的同源性分别为 68.3% 和 73.5%。序列分析结果表明 CMV-HLJ 和 CMV-YN 两个分离物属于 CMV 亚组。

关键词: 南瓜; CMV; IC-PCR; CP 基因

中图分类号: S 642.1; S 436.421 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 06-1237-04

Sequence Analysis of CP Genes of CMV from Pumpkin in Yunnan and Heilongjiang Provinces

Yang Guohui², Zhang Zhongkai¹, and Cui Chongshi^{2*}

(¹ Yunnan Key Lab of Agricultural Biotechnology, Kunming, Yunnan 650223, China; ² Horticultural College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: The CP genes were amplified by IC-PCR from CMV-HLJ and CMV-YN isolated from pumpkin in Heilongjiang and Yunnan Provinces and cloned to pGEM-T vector. Analysis of nucleotide sequence showed that the length of CP genes of CMV-HLJ and CMV-YN was 657 bp, encoding 219 amino acid. The homology of nucleotide and amino acid sequences of CP gene between these two isolates was 96.8% and 97.4% respectively. The homology of nucleotide and amino acid sequences of CP gene of these two isolates was higher than 90% and 97% respectively compared with six external isolates of CMV subgroup, and 66.4% and 73.4% respectively compared with another six external isolates of CMV subgroup, and higher than 89.5% and 93% respectively compared with ten Chinese isolates of CMV subgroup, and 68.3% and 73.5% respectively compared with two Chinese isolates of CMV subgroup. All these data showed that CMV-HLJ and CMV-YN belonged to CMV subgroup.

Key words: Pumpkin; CMV; IC-PCR; CP gene

黄瓜花叶病毒 (*Cucurbit mosaic virus*, CMV) 是雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员。病毒粒子为等轴对称的 20 面体, 直径约 29 nm, 其寄主范围广, 能侵染 1 000 多种植物^[1], 所有葫芦科植物均可被侵染, 为葫芦科作物在世界范围内常易发生的 5 种病毒病之一^[2]。几十年来, 我国先后从 38 科的 120 多种植物上分离到 CMV, 在葫芦科作物上研究报道较多的是西瓜、甜瓜^[3,4], 采用的研究方法主要是生物学方法和血清学方法。

黑龙江省和云南省是我国南瓜 (*Cucurbita moschata* Linn.) 生产大省, 近年来随着栽培面积的不

收稿日期: 2006-04-11; 修回日期: 2006-06-21

基金项目: 云南省农业生物技术重点实验室开放基金资助项目 (2001B-3)

* 通讯作者 Authors for correspondence (E-mail: shwkj@mail.neau.edu.cn)

断扩大, 病毒病害日益加重, 为此, 开展了对两省南瓜病毒病的研究。本研究是采用免疫捕捉多聚酶链式反应 (Immuno-Capture PCR, IC-PCR) 方法, 对从南瓜上获得的 CMV 分离物的 CP 基因进行克隆和序列分析, 以便从分子水平上进一步确定所属株系, 为南瓜主要病毒病的防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

云南省南瓜病样于 2002 年 3 月采自于云南省思茅港市, 病样为果实, 表现症状为果实粗糙; 黑龙江省南瓜病样于 2002 年 7 月采自于东北农业大学香坊试验农场, 病样为叶片, 表现症状为花叶、叶片畸形。经电镜和 ELISA 检测均为 CMV, 分别命名为黄瓜花叶病毒云南分离物 (CMV-YN) 和黄瓜花叶病毒黑龙江分离物 (CMV-HLJ)。

1.2 方法

1.2.1 病样的 IC-PCR 检测 CMV 的外壳蛋白基因引物参照徐平等^[5]的报道设计合成 L1: 5'-ATG-GACAAA TCTGAA TCAACC-3', L2: 5'-TAA GCTGGA TGGACA ACCCGT-3'。

在 PCR 管中加入按 1:3000 比例稀释的 CMV 兔多抗血清, 37℃ 包被 3 h, PBST 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 3 次。病叶以 1:10 的比例稀释后加入, 37℃ 包被 3 h, PBST 洗涤 3 次, Milli-Q H₂O (超纯水) 洗涤 1 次, 进行反转录和 PCR 反应, 反转录和 PCR 反应体系及反应条件参照文献 [6] 的方法, 以健康植株为阴性对照, CMV 多抗血清由云南省农业科学院生物技术所植物病理中心自制。

1.2.2 外壳蛋白基因的克隆 利用上海华舜生物工程有限公司的胶回收试剂盒回收目的片段, 克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 中, 转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 利用蓝白斑法筛选阳性克隆并利用 PCR 和酶切方法进行鉴定。质粒提取采用 Qiagen 公司的 Qiagen Plasmid Miniprep Kit 试剂盒, 酶切所用酶为 Promega 公司的 BstI。

1.2.3 测序及序列分析 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成, 测序时选取 2~3 个阳性克隆, 双向测序, 测序引物为 T7/SP6, 获得的序列利用 DNASIS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 CMV 的 IC-PCR 检测结果

利用 IC-PCR 方法, 从 CMV 的两个南瓜分离物中均扩增出约 700 bp 的目标条带, 而阴性对照在此位置没有条带 (图 1)。

2.2 重组质粒的鉴定

从每个分离物的转化平板上挑取 5 个白色菌落进行 PCR 检测, 结果表明所挑取的菌落中部分含有插入片段, 挑取经 PCR 检测含有插入片段的菌落在 37℃ 摇床中培养过夜, 提取质粒, 利用 BstI 酶进行酶切, 两个分离物在约 800 bp 切下目标片段 (图 2)。

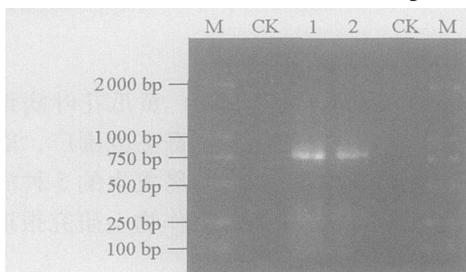


图 1 CMV 的 IC-PCR 扩增

M: DNA marker; CK: 阴性对照; 1: CMV-HLJ; 2: CMV-YN。

Fig 1 IC-PCR amplification of CP genes of CMV-HLJ and CMV-YN

M: Marker DL 2 000; CK: Healthy pumpkin; 1: CMV-HLJ isolated from Heibongjiang; 2: CMV-YN isolated from Yunan

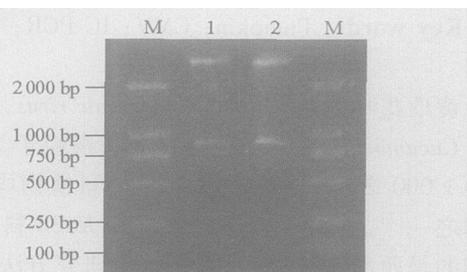


图 2 CMV 重组质粒的酶切鉴定

M: Marker DL 2 000; 1: CMV-HLJ; 2: CMV-YN。

Fig 2 Detection of CMV recombinant products digested with restriction enzyme

2.3 插入片段的序列分析

序列分析表明, CMV 黑龙江分离物 (CMV-HLJ) 和 CMV 云南分离物 (CMV-YN) CP 基因长为 657 bp, 编码 219 个氨基酸 (GenBank 登录号为 DQ459481, DQ459482), 两个分离物的核苷酸和氨基酸同源性分别为 96.8% 和 97.4%, 和国外 CMV 亚组 6 个分离物 (CMV-ABI, CMV-BA, CMV-C, CMV-FNY, CMV-NY, CMV-TFN) 的核苷酸序列同源性都在 90% 以上, 氨基酸同源性在 97% 以上。和 CMV 亚组 6 个分离物 (CMV-KI, CMV-M2, CMV-Q, CMV-SN, CMV-TRK, CMV-WL) 的同源性分别为 66.4% 和 73.4%。和国内 CMV 亚组 分离物 (CMV-BD, CMV-M, CMV-PE, CMV-PF, CMV-SD, CMV-YNT, CMV-ZI1, CMV-ZI2, CMV-ZI3, CMV-ZI4) 相比, CMV-HLJ 无论是核苷酸还是氨基酸序列都和山东分离物 (CMV-SD) 的同源性最高, 为 98%, CMV-YN 和山东分离物 (CMV-SD) 的核苷酸和氨基酸序列同源性分别达到 96.8% 和 99%, 和海南分离物 (CMV-PF) 氨基酸的同源性也达到 99%, 而和两个 CMV 亚组 分离物 (CMV-XB, CMV-YNB) 的同源性分别为 68.3% 和 73.5% (表 1)。

3 讨论

研究者根据寄主反应、血清学关系、病毒外壳蛋白肽链图谱分析核酸杂交、RT-PCR 产物酶解分析及核苷酸序列分析, 将现有的 CMV 株系或分离物区分为 2 个亚组。从已测定部分序列的 50 多个 CMV 株系的 CP 基因同源率看, 同一亚组不同分离物的同源率均在 90% 以上, 而不同亚组间分离物的同源率则仅在 70% ~ 80%^[1,7-9]。本研究表明, 无论是 CMV 黑龙江分离物还是云南分离物和国内外 14 个 CMV 亚组 分离物 CP 基因核苷酸的同源性都达到 90% 以上 (和国内的两个分离物 CMV-ZI1、CMV-ZI2 同源性在 90% 以下, 但达到了 89.6%), 而和亚组 分离物的 CP 基因核苷酸同源性在 69% 以下, 说明这两个分离物都属于 CMV 亚组。

CMV 可通过 60 多种蚜虫进行传播, 但研究者也发现了一些不能被蚜虫传播的分离物。王海河等^[10]对失去蚜传特性的 CMV-M 株系的 RNA3 进行了全序列分析, 分析结果表明 M 株系 CP 第 215 位的 G 改变为 R, 他认为这很可能是 M 株系失去蚜传能力的根本原因, 并且推测不同株系的独特性质是由某个特异的核苷酸或氨基酸决定的。本研究中对 CMV 云南、黑龙江两个分离物的外壳蛋白序列分析表明在第 215 位都为 G, 说明这两个 CMV 分离物的 CP 基因都具有蚜传结构特征。

采用抗病品种是防治病毒病的有效措施, 但目前传统杂交育种存在缺乏理想的抗源材料、育种周期长等问题。抗病毒基因工程是培育抗病品种的一种理想方法, 而导入 CMV CP 基因是目前介导 CMV 抗性较为成功的一种方法, 但总的说来采用单一基因策略获得的工程植株多数情况下表现的是阶段抗病性及延迟发病^[11]。主要的葫芦科作物在生长中容易受到几种病毒的混合侵染, 为了扩大转基因植株的抗病范围, 国外研究者将两种或多种病毒的 CP 基因转化到葫芦科作物上^[12,13]。本研究通

表 1 CMV 黑龙江、云南分离物和国内外 CMV 分离物的核苷酸、氨基酸序列的同源性

Table 1 Homology of nucleotide and amino acid sequences of CP genes of CMV-YN and CMV-HLJ compared with external and Chinese isolates

CMV 亚组 CMV Subgroup	分离物 Isolates	同源性 Homology (%)		登录号 GenBank accession
		CMV-HLJ	CMV-YN	
国外 Overseas	CMV-YN	96.8 (97.4)		
	CMV-ABI	97.8 (97.7)	96.8 (97.4)	L36525
	CMV-BA	90.2 (97.4)	90.2 (98.3)	U43888
	CMV-C	92.6 (97.4)	92.6 (96.8)	D42079
	CMV-FNY	90.2 (97.4)	90.2 (98.3)	D10538
	CMV-NY	90.2 (97.4)	90.2 (98.3)	U22821
国外 Overseas	CMV-TFN	91.2 (97.4)	91.2 (99.0)	Y16926
	CMV-KI	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	Z12818
	CMV-M2	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	AB006813
	CMV-Q	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	J02059
	CMV-SN	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	U22822
	CMV-TRK	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	L15336
国内 Domestic	CMV-WL	66.4 (73.4)	66.4 (73.4)	D00463
	CMV-BD	94.3 (93.1)	94.3 (93.1)	X65017
	CMV-M	91.8 (95.3)	91.8 (95.3)	AF268599
	CMV-PE	92.3 (97.6)	92.3 (97.6)	AF268597
	CMV-PF	93.6 (98.0)	93.6 (99.0)	AF368192
	CMV-SD	98.0 (98.0)	96.8 (99.0)	AB008777
国内 Domestic	CMV-YNT	92.3 (97.6)	92.3 (97.6)	AJ239098
	CMV-ZI1	89.6 (96.0)	89.6 (96.0)	AF33968
	CMV-ZI2	89.6 (96.0)	89.6 (96.0)	AY138992
	CMV-ZI4	91.8 (97.6)	91.8 (97.6)	AJ006998
	CMV-XB	68.3 (73.5)	68.3 (73.5)	AF268598
	CMV-YNB	68.3 (73.5)	68.3 (73.5)	AJ242585

注: 括号外为核苷酸序列, 括号内为氨基酸序列。

Note: The numbers outside brackets are homology of the nucleotide sequences and the numbers inside brackets are homology of the amino acid sequences

过在黑龙江、云南两省采集南瓜病样, 已确定云南省南瓜的主要病毒病原为番木瓜环斑病毒西瓜株系 (*Papaya ring spot virus W*, PRSV-W)、CMV, 黑龙江省南瓜的主要病毒病原为 CMV、西瓜花叶病毒 2 号 (*Watermelon mosaic virus 2*, WMV-2), 并已分别克隆了其 CP 基因。今后可在此基础上, 针对两省主要的南瓜病毒病分别构建含有 PRSV-W 和 CMV, CMV 和 WMV-2 的 CP 基因的表达载体并转化到南瓜中, 从而提高转基因植株的抗病性。

参考文献:

- 徐平东, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组研究进展. 福建农业大学学报, 1998, 27 (1): 82~91
Xu P D, Xie L H. Advances in subgroup research of cucumber mosaic *Cucumovirus*. Journal of Fujian Agricultural University, 1998, 27 (1): 82~91 (in Chinese)
- 李丙东, 万巧兰. 用生物技术和自然抗性获得对葫芦科蔬菜作物病毒病的抗性. 中国蔬菜, 1997 (4): 55~57
Li B D, Wan Q L. Virus disease in vegetable of Cucurbitaceae acquired resistance by biotechnology and natural resistance. China Vegetables, 1997 (4): 55~57 (in Chinese)
- 魏宁生, 吴云峰. 陕西省西瓜甜瓜病毒病的研究. 陕西农业科学, 1993 (2): 11
Wei N S, Wu Y F. Research on watermelon and melon virus disease in Shanxi. Shanxi Agricultural Sciences, 1993 (2): 11 (in Chinese)
- 李向东. 山东省侵染西瓜的西瓜花叶病毒 (WMV-2) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 的研究. 山东农业大学学报, 1995 (3): 351~355
Li X D. Identification of viruses infecting watermelon (*Citrullus vulgaris*) in Shandong province. Journal of Shandong Agricultural University, 1995 (3): 351~355 (in Chinese)
- 徐平东, 周仲驹, 林奇英, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组和分离物外壳蛋白基因的序列分析与比较. 病毒学报, 1999, 15 (2): 164~171
Xu P D, Zhou Z J, Lin Q Y, Xie L H. Coat protein gene sequences analysis and comparison of cucumber mosaic virus subgroup and isolates in China. Journal of Virology, 1999, 15 (2): 164~171 (in Chinese)
- 杨国慧, 张仲凯, 崔崇士. 西瓜花叶病毒 2 号南瓜分离物的鉴定及其外壳蛋白基因序列分析. 植物病理学报, 2004, 34 (1): 8~13
Yang G H, Zhang Z K, Cui C S. Identification of *Watermelon mosaic virus 2* pumpkin isolate and its coat protein gene sequence. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34 (1): 8~13 (in Chinese)
- Rizzos H, Gumnn L V, Pares R D. Differentiation of *Cucurbit mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. J. Gen. Virol., 1992, 73: 2099~2103
- Palukaitis P, Roossinck M J, Diezgen R G. *Cucurbit mosaic virus*. Adv. Virus Res., 1992, 41: 281~348
- Chaumpluk P, Sasaki Y, Nakajima N. Six new subgroup Members of Japanese *Cucurbit mosaic virus* as determined by nucleotide sequence analysis on RNA3's cDNAs. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 1996, 62: 40~44
- 王海河, 蒋继宏, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒 M 株系 RNA3 的变异分析及全长结构的构建. 农业生物技术学报, 2000, 8 (2): 180~185
Wang H H, Jiang J H, Wu Z J, Lin Q Y, Xie L H. Diversity analysis of RNA3 *Cucurbit mosaic virus* strains M and construction of its full-length cDNA clone. Journal of Agricultural Biotechnology, 2000, 8 (2): 180~185 (in Chinese)
- 李爱林, 薛林宝, 张永泰, 惠飞虎. 黄瓜花叶病毒病防治策略研究进展. 长江蔬菜, 2004 (3): 38~42
Li A L, Xue L B, Zhang Y T, Hui F H. Research progress of tactics for cucumber mosaic virus control. Journal of Changjiang Vegetables, 2004 (3): 38~42 (in Chinese)
- Fuchs M, Gonsalves D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon virus 2 to mixed infections by both potyviruses. Bio. Technology, 1995, 13: 1466~1473
- Fuchs M, Tricoli D M, Camey K J. Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. Plant Disease, 1998, 82 (12): 1350~1356