

马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因的克隆与系统进化分析

黄永会^{1,2}, 朱英^{1,2}, 刘永翔^{1,2}

(1. 贵州省生物技术研究所, 贵州贵阳 550006; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州贵阳 550006)

摘要 从贵州威宁等地采集马铃薯病叶样本, 采用试管捕捉反转录 PCR (tube-capture-RT-PCR, TC-RT-PCR) 的方法克隆出 714 bp 的 PVX CP 基因, 编码 237 个氨基酸残基。系统进化分析表明, PVX CP 基因可分为两大类群, 推测分离物属于 X³ 株系, 并建议重型花叶也可作为 PVX 病叶样本。

关键词 马铃薯 X 病毒; 外壳蛋白; 基因克隆; 进化分析

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-09283-03

Cloning and Phylogenetic Analysis of Potato Virus X CP Gene

HUANG Yong-hui^{1,2}, ZHU Ying^{1,2}, LIU Yong-xiang^{1,2} (1. Guizhou Institute of Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006; 2. Guizhou Key Lab for Agricultural Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract Potato leaves with PVX infection symptoms were collected from Guizhou Province including Weining County. A PVX CP gene of 714bp encoding 237 amino acid residues was cloned with the tube capture RT-PCR (TC-RT-PCR) method. Phylogenetic analysis revealed that PVX CP genes can be divided into two groups, and the isolate was estimated to be X³ strain. Furthermore, We suggested that severe mosaic leaves could also be samples for PVX gene cloning.

Key words Potato virus X (PVX); Coat protein (CP); Gene cloning; Phylogenetic analysis

马铃薯 X 病毒 (Potato virus X, PVX) 是 *Potexvirus* 属病毒, 在全世界马铃薯种植区域都有发生, 通常造成 15% 的减产, 而与其他病毒复合侵染则会造致命损害。根据栽培马铃薯对植物抗病基因 Nb、Nx 和 Rx 的不同反应, PVX 通常可以划分为 X¹、X²、X³ 和 X⁴ 4 个株系。X¹ 株系在 Nb 或 Nx 存在时引起超敏反应, X² 株系只在 Nb 存在时引起超敏反应, X³ 株系只在 Nx 存在时引起超敏反应, X⁴ 株系在 Nb 和 Nx 存在时均无反应, 但不能侵染携带 Rx 基因的植株^[1-2]。

PVX 基因组有 5 个开放阅读框, 外壳蛋白由 ORF5 编码, 其主要功能定义为在病毒结构中为病毒基因核苷酸提供包被, 保护了病毒基因组信息流失。外壳蛋白在病毒感染植株的传播中具有重要作用, 包括长距离微管运输和细胞间的移动^[3]。而且, 外壳蛋白可能参与病毒生活史中其他阶段的活动, 如病毒复制、介体传播以及沉默抑制^[4-5]。

笔者以克隆并测序的 PVX CP 基因序列为原始数据, 检索 GenBank 数据库中已知 PVX CP 基因序列, 借助生物信息学软件对这些序列进行同源比对和系统树构建, 对 PVX CP 基因系统进化关系与分组进行探讨, 为 PVX 病毒控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 病毒样本。从贵州省农业科学院试验地、贵州威宁县和瓮安县田间采集花叶症状的马铃薯病叶, 保存于 -70 °C 冰

箱中。阴性对照无毒苗由贵州省马铃薯工程中心提供。

1.1.2 主要试剂与菌株。M-MLV 反转录酶、RNase 抑制剂、Taq 酶、T₄ DNA 连接酶和 pMD18-T 质粒购自大连宝生物公司, DTT 溶液和琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司, X-gal 和 IPTG 购自 MBI 公司, 胶回收试剂盒和 DNA Marker 购自 Tiangen 公司, 所有化学试剂均为国产分析纯。大肠杆菌 DH5a 由贵州省农业生物技术重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。参照 Genbank 中已登录的 PVX CP 基因序列, 利用 Primer premier 5.0 设计合成扩增 PVX CP 基因的一对引物 (PVXf: 5'-GAATGTCAGCACACCAGCTAGCAC-3' 和 PVXr: 5'-GCTTATGGTGGTGGGAGACTGAC-3'), 由北京三博远志生物有限公司合成。

1.2.2 TC-RT-PCR 方法扩增 PVX CP 基因。参照邱又彬等^[6]的方法。

1.2.3 克隆连接与测序。采用 Tiangen 胶回收试剂盒纯化 700 bp 左右的 PCR 产物, 将其与 pMD18-T 连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素 (50 mg/ml) 抗性的 LB 固体培养基平板上培养后挑取阳性克隆, 将阳性克隆菌液送北京诺塞基因有限公司测序。

1.2.4 序列分析。从 Genbank 下载的 PVX CP 基因与该研究测序获得的序列用 DNAMAN 软件分析并保存, 然后用 Clustal X 比对并用 Mega 4.0 软件^[7]建树, 步差值为 1 000, 用 Kimura 两参数法估计遗传距离。

2 结果与分析

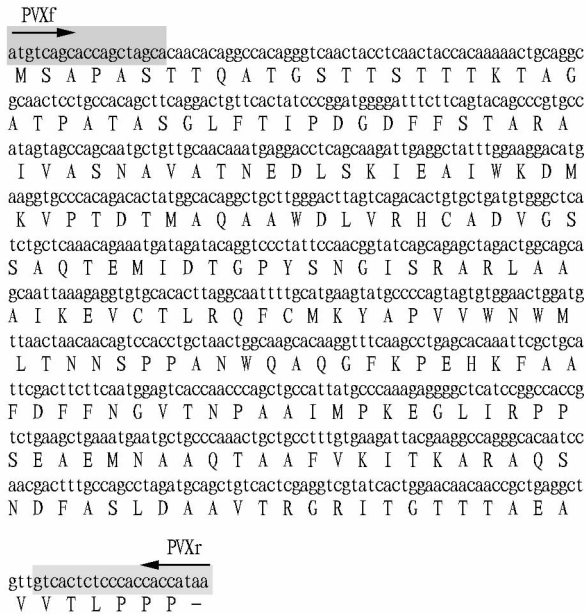
2.1 鉴定结果 共采集到 63 份病叶样本, 18 份来自贵州省农业科学院试验大棚与试验田中, 28 份来自于威宁县, 17 份来自瓮安县。以设计合成的特异性引物 PVXf 和 PVXr 进行 TC-RT-PCR 扩增 PVX CP 全序列, 结果表明, 来自威宁县小山乡的一份样本中克隆得到 1 个目的片段。PCR 产物约 700 bp, 通过胶回收纯化后连接 pMD18-T 载体并测序, 得到此产

基金项目 贵州省农业科学院研究生科研创新基金项目“抗病毒转基因马铃薯的荧光原位杂交 (FISH) 研究”[黔农科合(创新基金)2011011 号]; 贵州省科研机构创新能力建设专项“药用植物和作物资源研究与开发应用创新能力建设”[黔科合院所创能[2010]4002]。

作者简介 黄永会(1981-), 女, 贵州瓮安人, 助理研究员, 硕士, 从事植物基因工程研究。

收稿日期 2014-08-15

物为714 bp,编码237个氨基酸残基。核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列见图1。根据来源与编号将克隆出PVX CP的样本分离物命名为XSH2。



注:氨基酸序列由 Expsay 翻译工具翻译 (<http://www.expsay.org/tools/dna.html>);灰色显示为正反引物所在位置。

图1 XSH2 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

2.2 序列分析 将XSH2 CP核苷酸序列输入NCBI数据库进行BLASTn检索,结果显示,此序列与已登录的PVX CP基因有99%的同源性,表明XSH2 CP确实是PVX CP基因。根据BLAST结果,选取来自世界不同地区的17条PVX CP基因序列与XSH2用DNAMAN软件进行比对分析,核苷酸与氨基酸水平的对比结果见表1。

表1 XSH CP核苷酸、氨基酸序列与其他PVX CP基因序列相似度

序列号	来源	核苷酸相		氨基酸相	
		似度/%	似度/%	似度/%	似度/%
D87962	Japan	98.8		99.6	
EU031437	Beijing, China	98.3		99.2	
FJ461343	Iran	97.7		99.2	
AJ505748	Spain	97.6		100.0	
D00344	Netherlands	97.6		100.0	
AY512654	Zhejiang, China	97.5		99.2	
Z29333	Estonia	97.3		98.7	
AF272736	Taiwan, China	97.3		100.0	
X88784	UK	97.2		100.0	
Z34261	Argentina	96.9		100.0	
EF063709	Guizhou, China	96.8		99.6	
FJ643623	India	96.5		97.9	
GQ496608	Latvia	96.1		99.2	
AF260641	Korea	95.9		99.2	
AF202462	Canada	95.9		100.0	
EU021215	Russia	95.3		99.6	
AY763582	Egypt	94.9		97.9	

从表1可以看出,XSH2 CP与来自世界不同地方的17条PVX CP序列有很高的核苷酸与氨基酸序列同源性。它

与来自西班牙、荷兰、台湾、英国、阿根廷和加拿大的几个分离物氨基酸同源性最高,达到100%,说明他们之间是同义突变。来自我国的3个分离株与XSH2 CP核苷酸同源性超过96%,而氨基酸同源性超过99%,表现出一定的地域相关性。

为进一步探索PVX CP的系统进化关系,从NCBI数据库中选取不同地理来源的57个PVX CP基因与XSH2 CP进行比对,以白三叶草花叶病毒(white clover mosaic virus, WCIMV)登录号为X16636的序列作为外群构建PVX CP系统进化树(图2)。

除来自英国的X88781、X88782与X88785有744个碱基对,AF172559、M31541和其他几个分离物只有711个碱基对,其他所有PVX CP基因都含有714个碱基对,编码237个氨基酸残基。XSH2与GenBank中其他PVX分离物的CP核苷酸序列同源性在78.6%~98.8%,氨基酸序列同源性在86.9%~100%。由图2可知,PVX CP基因划分为一大一小2个群组。群组I聚集了45个来自世界不同地域的分离物,群组II聚集了来自南美的8个分离物和来自英国的4个分离物。包括XSH2在内的来自我国的分离物分散到群组I中的各个亚组中,但相互之间进化距离都很近。据世界粮农组织的数据显示,马铃薯起源于南美,然后被引入欧洲、北美和前苏联的一些国家种植,但其在亚洲、非洲和拉丁美洲的生产和需求自1990年以来迅速增长。PVX CP基因的系统进化树揭示出由于马铃薯在全世界的传播种植,在马铃薯传播的同时,以块茎进行无性繁殖的特性也导致了病毒病在全球范围内的广泛传播。

从表1与图2可以看出,XSH2 CP与X³株系的来自荷兰的D00344具有100%的氨基酸同源性,在系统进化上距离也很近,因此可以推测分离物XSH2属于X³株系^[8]。姚东校等^[9]研究表明在贵州威宁分离得到的另一个PVX分离物属于X³株系,说明同一地域的马铃薯具有共同的引种来源,因此其携带的病毒同源性很高,变异度很小。

3 结论与讨论

PVX感染所引起的症状取决于PVX株系和马铃薯品种,一般情况下是肉眼观察不到的,所以也被称为潜隐病毒。幼嫩植株感染初期可见的症状主要是轻微的花叶症状,但此症状会随着温度的上升而变得不明显,16~20℃的多云天气有利于症状的形成。目前关于PVX病叶样品采集尚无统一标准,一般以轻型花叶为主。PVX感染症状的多变性使得病叶样品的采集实施较困难。该研究共采集了63份病叶样本,主要症状依据是轻型花叶,但只有一个样本成功检测和克隆得到了PVX CP,意外的是这个样本恰好表现严重花叶症状。据现有报道,运用血清学方法检测贵州马铃薯发现PVX发生率较低,不到10%^[9-10],因此如果想得到PVX分离物,选择适合的病叶样本很重要。该研究发现重型花叶症状的病叶也可用于PVX的分离与基因克隆,杜志游等^[11]研究表明,在湖南零星种植的地区一株表现重型花叶的马铃薯上获得PVX分离物,推测可能是因为PVX与马铃薯Y病毒

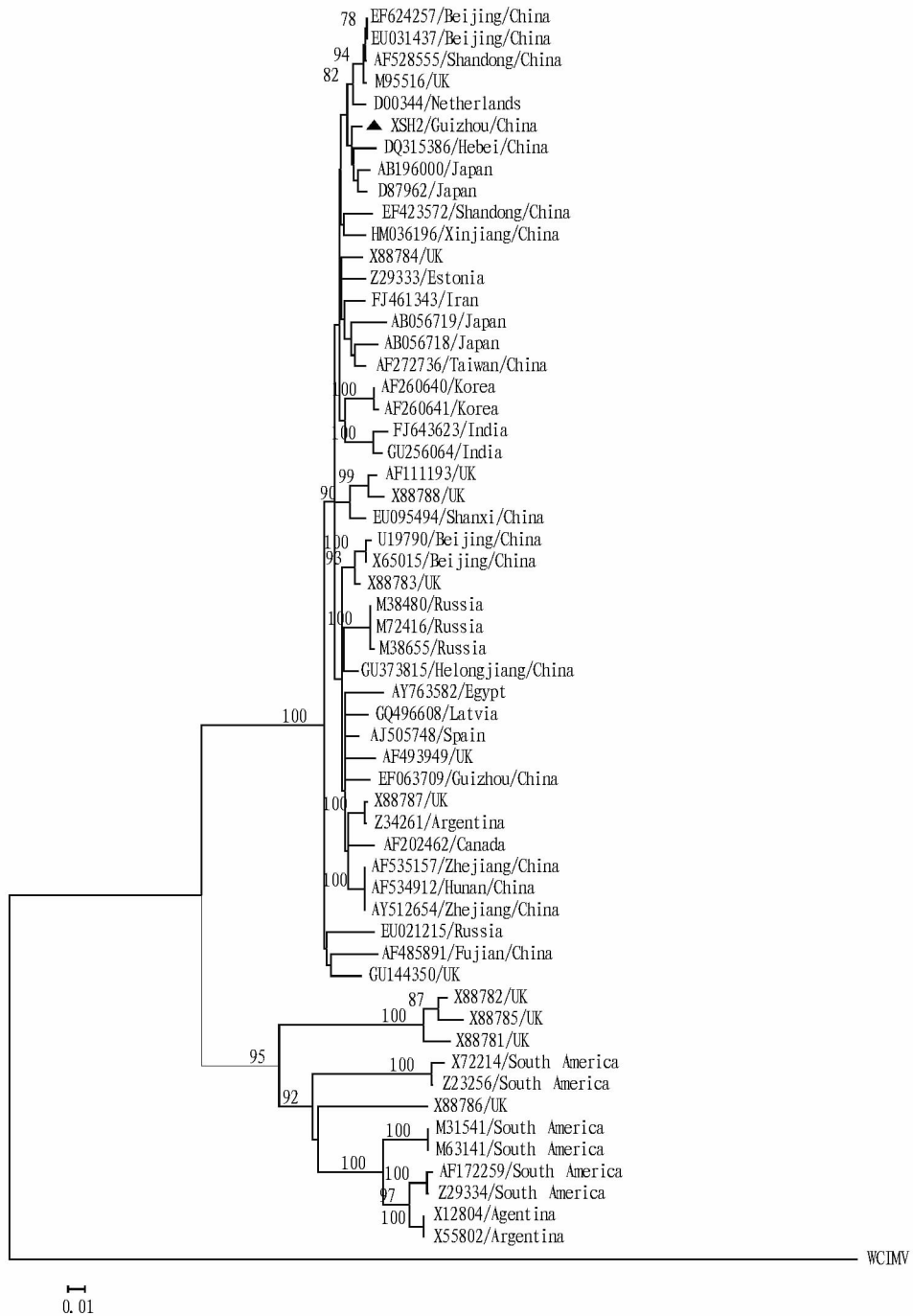


图2 PVX CP 基因系统进化树

(Potato virus Y, PVY) 等经常共同侵染从而表现严重症状。

病毒株系的鉴定是控制病毒的基础工作。PVX 的分类依赖于病毒对于抗性基因 Nb、Nx 和 Rx 的反应。研究表明 PVX CP 基因对于病毒-寄主互作非常重要, CP 基因中的第 121 和 127 个密码子揭示了马铃薯抗性突破 (resistance-breaking) 的主要决定因子^[12], 即 PVX CP 基因在 PVX 株系分类中发挥重要作用, 因此通过获得 CP 基因序列进行病毒鉴定, 是一种常见的手段。该研究对分离自贵州的 PVX CP 进行了序列测定与进化分析, 推测其属于 X³ 株系, 有助于生产实践中对

PVX 开展针对性防控, 对 PVX 病叶样本采集也提出了建议, 认为重型花叶也可以考虑作为 PVX 分离物的样本。

参考文献

- [1] COCKERHAM G. Strains of potato virus X [C]//Proceedings of the Second Conference of Potato Virus Disease. Lisse-Wageningen, 1954:89-92.
- [2] COCKERHAM G. Genetical studies on resistance to potato virus X and Y [J]. Heredity, 1970, 25:309-348.
- [3] FEDORKIN O N, SOLOVYEV A G, YELINA N E, et al. Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein [J]. J Gen Virol, 2001, 82:449-458.

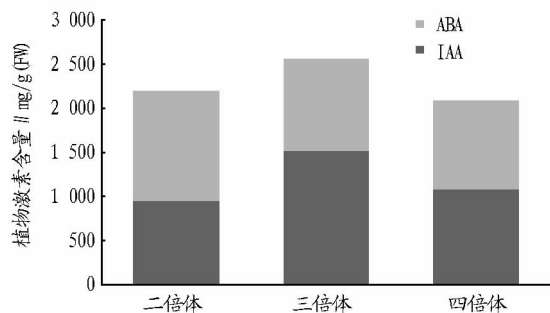


图1 不同倍性白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量

果发现,普通二倍体白桦叶芽中 IAA 含量最低,ABA 最高;三倍体的 IAA 含量最高;四倍体的 ABA 含量最低。单位质量的二、三、四倍体白桦叶芽中 IAA/ABA 的值分别为 0.76、1.45、1.06。对原始计算结果进行差异显著性分析显示,不同倍性白桦叶芽中 IAA 含量差异极显著($P < 0.01$),ABA 含量差异显著($P < 0.05$)。进一步的多重比较表明(Duncan 法, $\alpha = 0.05$),不同倍性白桦叶芽之间 IAA 含量差异均显著;而 ABA 只在二倍体与多倍体之间差异显著。

3 结论与讨论

人们对多倍体的研究已有很长的历史,多倍体植株常较普通二倍体生长发育缓慢,开花成熟晚,含水量高,渗透压低,植物组织内碳水化合物、维生素、蛋白质、叶绿素和一部分次生代谢产物含量显著升高^[6]。笔者所在实验室前期的研究发现,多倍体白桦与二倍体白桦相比,在胸径、叶片、气孔和果序方面明显增大。这些特点与内源激素含量的变化有着很大关系^[7]。对于单个或多个基因的多拷贝,有时会对内源激素产生重要影响,而其影响大小与插入基因拷贝数的多少关系不大。就吲哚-3-乙酸而言,即使插入的是其合成相关基因,也不能保证最终 IAA 表达的含量一定上升,这可能与基因的共抑制或插入位点不同有关^[8-10]。但关于多倍体植株,尤其是木本植物内源激素的报道尚不多见。一般认为,随着染色体倍数的增加,部分植物内源激素的含量会有所上升,而上升的比例与染色体增加的倍数并无多大关联^[11]。但也有报道发现,有时内源激素也会随着染色体倍

数的增加而降低^[12]。从此次试验的结果看,三、四倍体叶芽中 IAA 的含量明显高于二倍体,而 ABA 含量低于二倍体。观察三者的形态结构发现,三、四倍体叶芽的体积大,单个叶芽的质量也重,但芽的数量少;二倍体叶芽体积小,单芽质量轻,而芽的数量多,这可能与植物内源激素含量和互作的变化有很大关联。通过对四倍体和二倍体白桦基因转录组数据的分析也发现,在 IAA 合成途径中,四倍体较二倍体共有 11 个差异基因,全部上调表达,这从分子角度初步阐释了多倍体白桦 IAA 含量上升的机理。由于材料的限制,该试验的样本数较少,其测定结果是否具有普遍性尚需进一步验证;同时,由于多倍体的复杂性,染色体倍数的增加与内源激素含量的变化关系十分复杂,因此从不同角度对其进行研究阐述亦具有重要意义。

参考文献

- [1] 张志翔. 树木学(北方本)[M]. 北京:中国林业出版社,2008.
- [2] 杨婕,张日清,金晓玲. 高效液相色谱法在木本植物内源激素含量检测中的应用[J]. 经济林研究,2010(1):122-126.
- [3] 陈昆松,徐昌杰,李方,等. HPLC 法检测果实组织中内源 IAA、ABA 方法的改进[J]. 果树学报,2003(1):4-7.
- [4] ABUL Y, MENÉNDEZ V, GÓMEZ-CAMPO C, et al. Occurrence of plant growth regulators in *Psilotum nudum* [J]. Journal of Plant Physiology, 2010,167(14):1211-1213.
- [5] 赵晓菊,唐中华,郭晓瑞,等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定长春花中的 3 种内源激素[J]. 色谱,2006(5):534.
- [6] 潘一山,潘裕添,邹金美. 果树多倍体育种的探讨[J]. 漳州师范学院学报:自然科学版,2005,18(3):102-104.
- [7] KONDOROSI E, ROUDIER F, GENDREAU E. Plant cell-size control: growing by ploidy? [J]. Current Opinion in Plant Biology,2000,3(6):488-492.
- [8] JONES A M, IM K H, SAVKA M A, et al. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1 [J]. Science,1998,282(5391):1114-1117.
- [9] VAUCHERET H, FAGARD M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators [J]. Trends in Genetics,2001,17(1):29-35.
- [10] 郝宇,梁海永,杨敏生. 多拷贝 rol 基因对转基因杨树生长及内源激素的影响[J]. 林业科学,2010(5):58-63.
- [11] 孙敏红,张蜀宁. 二、四倍体不结球白菜子叶再生能力及其与内源激素的关系[J]. 南京农业大学学报,2006,29(2):25-28.
- [12] 罗向东,戴亮芳,钱春桃,等. 黄瓜属不同倍性异源多倍体的形态及生理特性分析[J]. 西北植物学报,2008,28(3):542-546.

(上接第 9285 页)

- [4] THOMAS C L, LEH V, LEDERER C, et al. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. Virology,2003,306:33-41.
- [5] QU F, REN T, MORRIS T J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step [J]. J Virol, 2003, 77(1):511-522.
- [6] 邱又彬,陶刚,黄永会,等. TC-RT-PCR 技术在马铃薯病毒检测及其基因克隆上的应用[J]. 西南农业学报,2009, 22(2):329-331.
- [7] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24:1596-1599.
- [8] HUISMAN M J, LINTHORST H J M, BOL J F, et al. The complete nucle-

otide sequence of Potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses [J]. J Gen Virol,1988, 69:1789-1798.

- [9] 姚东校,洪鲲,杨立昌,等. 马铃薯 X 病毒贵州分离物的分子鉴定[J]. 广东农业科学,2013(13):139-141.
- [10] 颜谦,黄萍,宋吉轩,等. 贵州不同海拔地区马铃薯病毒病初步调查及检测鉴定[J]. 安徽农业科学,2009,37(29):14262-14263.
- [11] 杜志游,陈集双. 马铃薯 X 病毒湖南分离物的鉴定与分组研究[J]. 中国病毒学,2003,18(2):119-123.
- [12] GOULDEN M, KOHM B, CRUZ S S, et al. A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness [J]. Virology, 1993, 197:293-302.