

马铃薯 PLRV 病毒宁夏分离物外壳蛋白基因 CP 的克隆与序列分析

陈晓军¹, 郭成瑾^{2*}, 王喜刚², 沈瑞清² (1. 宁夏农林科学院农业生物技术研究中心/宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏银川 750002; 2. 宁夏农林科学院植物保护研究所/宁夏植物病虫害防治重点实验室, 宁夏银川 750002)

摘要 利用双抗体夹心酶联免疫吸附法分离得到了 PLRV 宁夏分离物, 并采用 RT-PCR 技术分离得到了宁夏分离物外壳蛋白基因 CP 的核苷酸序列, PLRV CP 基因共 624 bp, 推测编码 208 个氨基酸残基, 分子量大小为 23 234.2, 等电点 11.85。通过同源性分析, 其与 2013 年内蒙古分离物 (KC456052) 最为接近, 同源性达 99.8%; 进化树分析发现其有一定的地理区域性, 为单独分支起源。

关键词 马铃薯卷叶病毒; 反转录; 宁夏 PLRV 分离物

中图分类号 S435.32; S432.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)11-0096-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.11.026

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Molecular Biological Identification of Potato Leafroll Virus from Field Samples in Ningxia Province

CHEN Xiao-jun¹, GUO Cheng-jin², WANG Xi-gang² et al (1. Agricultural Biotechnology Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Plant Disease and Pest Control, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract PLRV CP gene was isolated from Ningxia by DAS-ELISA method. The nucleotide sequence of CP gene of PLRV isolated from Ningxia was obtained by RT-PCR. The total length of PLRV CP gene was 624 bp. It was inferred that PLRV CP gene encoded 208 amino acid residues with molecular weight of 23 234.2 and pI of 11.85. Through homology analysis, it was the closest to the isolate (KC456052) from Inner Mongolia in 2013, with 99.8% homology; phylogenetic tree analysis showed that it had a certain geographical region, which was a single branch origin.

Key words PLRV; RT-PCR; Ningxia isolate

马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV) 是导致马铃薯严重减产的病毒病, 通过蚜虫传播, 也通过感染病毒的块茎传播, 造成 30%~80% 的产量损失^[1]。马铃薯作为宁夏南部山区重要的粮食、蔬菜兼用的经济作物, 种植面积达 109 927 hm²^[2]。马铃薯病毒病时常蔓延, 其中 PLRV 导致马铃薯产量和质量大幅下降。我国已对内蒙古、青海、甘肃、广东、河北等省区的 PLRV 分离物进行同源性分析, 然而宁夏仍缺乏该病毒分离物的序列分析。为此, 笔者利用双抗体夹心酶联免疫吸附法分离得到了 PLRV 宁夏分离物, 并采用 RT-PCR 技术分离得到了宁夏分离物外壳蛋白基因 CP 的序列, 为该病毒病的防治和流行病学奠定研究基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂。 马铃薯 PLRV 病毒 ELISA 试剂盒购于黑龙江省农业科学院, RNA 提取试剂盒为 SV Total RNA Isolation System (promega); RNA 反转录试剂盒为 mProm-II Reverse Transcriptase (promega), 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega); T 连接载体试剂盒为北京全式金生物技术公司的 pEasy-Blunt Simple Cloning Kit, Pfu DNA 聚合酶与 DNA 分子量 marker 为天根生物技术公司产品; 引物由北京奥科鼎盛公司合成; 其

余试剂均为分析纯。

1.1.2 马铃薯病毒样本。 2011 年 7 月, 马铃薯 PLRV 病毒样本在宁夏固原农业推广总站试验田中获得, 选择有症状的或从植株的顶部、中部和底部各取 1 片叶子合在一起, 带回实验室于 -70 °C 低温保存。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯 PLRV 病毒的确定。 将马铃薯病叶样品 (0.10~0.15 g) 放于塑料袋中, 用记号笔标记好。向样品袋中加入 1.0~1.5 mL 提取缓冲液 (样品重量: 样品提取缓冲液 = 1:10), 将样品充分研磨。将样品袋中的溶液挤到 1.5 mL 的离心管中, 4 000 r/min 离心 3 min, 取上清液备用。然后按试剂盒说明进行双抗体夹心酶联免疫吸附 (DAS-ELISA) 测定。选定阳性植株备用。

1.2.2 马铃薯总 RNA 提取。 对阳性材料采用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒提取总 RNA, 试验步骤按试剂盒操作说明进行, 吸取 10 μL 用于 1% 琼脂糖电泳, 余量 RNA 保存于 -70 °C 超低温冰箱备用。

1.2.3 引物设计。 从 Genbank 中获得 PLRV 基因组核苷酸序列 (FJ859020.1, FJ853192.1, AY307123.1, X13906.1, GU256062.1, FJ481109.1), 利用 BLAST 和 Clustal 软件进行保守性分析, 设计引物序列:

上游引物 PLRV_CPF: 5'-ATGAGTACGGTCGTGGTTA-AAGGAAATG-3'

下游引物 PLRV_CPR: 5'-CTATTTGGGGTTTTGCAAAGCCACCCT-3'

引物由北京奥科生物科技有限公司合成。

1.2.4 RT-PCR 扩增。 按 Promega 公司 mProm-II Reverse Transcriptase 试剂盒说明进行。取 2 μg 马铃薯总 RNA, 以

基金项目 宁夏自然科学基金项目“SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测马铃薯炭疽病菌体系的建立与应用”(2020AAC03316); 宁夏农林科学院科技创新引导项目“高效作物土传病害微生物生态调控剂研制”(NKYG-18-07)。

作者简介 陈晓军 (1977—), 男, 江苏靖江人, 副研究员, 博士, 从事植物病毒分子生物学研究。* 通信作者, 副研究员, 博士, 从事马铃薯病虫害防治研究。

收稿日期 2020-10-10

Oligo dT 为引物,进行总 cDNA 反转录。反应体系为 20 μ L, MMLV RT buffer 4 μ L, 总 RNA 2 μ L, dNTP 2 μ L, 反转录酶 MMLV 1 μ L, Oligo (dT)₁₆ 1 μ L, RNA 酶抑制剂 RNasesin 0.5 μ L, DEPC 处理的 H₂O 至 20 μ L。反转录反应为 42 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 3 $^{\circ}$ C 3 min。反转录产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。以 PLRV_CPF、PLRV_CPR 为上下游引物,反转录产物为模板扩增马铃薯 PLRV 病毒 CP 蛋白基因。PCR 反应体系为 25 μ L, 包含 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/ μ L) 1.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/ μ L) 各 1 μ L, Taq 聚合酶 (5 U/ μ L) 1 μ L, 总 cDNA (1 μ g/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 25 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上电泳, 电压为 8 V/cm。

1.2.5 目的条带的回收与 T 载体克隆。用 DNA 回收试剂盒回收扩增产物, 连接 pEasy-Blunt Simple 载体, 连接体系: PCR 胶回收产物 4 μ L, 载体 1 μ L; 连接 15 min 后进行转化, 在氨苄青霉素的 LB 平板涂板, 过夜培养后挑取 10 个克隆分别进行摇菌培养, 选取 3 个经 PCR 检测为阳性的克隆送至英俊生物公司测序。

1.2.6 马铃薯 PLRV 病毒 CP 蛋白基因序列分析。对编码马铃薯 PLRV 病毒 CP 蛋白基因序列采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 中的 BLAST 软件和 DNAMAN 7.0 进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 马铃薯总 RNA 的提取 利用 RNA 提取试剂盒提取马铃薯总 RNA 电泳结果见图 1, 样品上样量为 10 μ L, 1、2 道均为马铃薯 PLRV 病毒阳性植株。

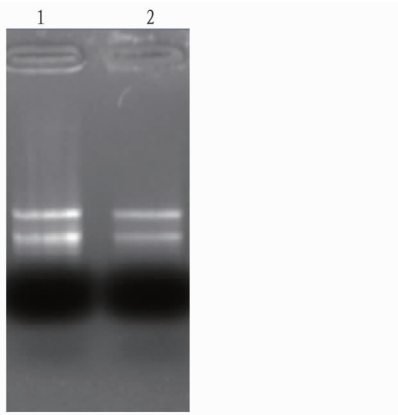


图 1 马铃薯总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Results of total RNA electrophoresis in potato

2.2 RT-PCR 结果 从图 2 可见, 1、2 号样品均扩增出 627 bp 的目标条带, 与设计大小一致。

2.3 马铃薯 PLRV 病毒 CP 的序列特征 PLRV CP 基因共 624 bp, 推测编码 208 个氨基酸残基, 分子量大小为 23 234.2, 等电点 11.85, 没有明显的跨膜蛋白 (图 3)。PLRV CP 蛋白中的 17-PRRRRRQSLRRRANR-31 区域起到核定位信号 NLS (nucleolar localization signal) 的功能, 使 CP 和通读蛋白 (RTP) 被翻译后主要存在于细胞核, 少量存在于细

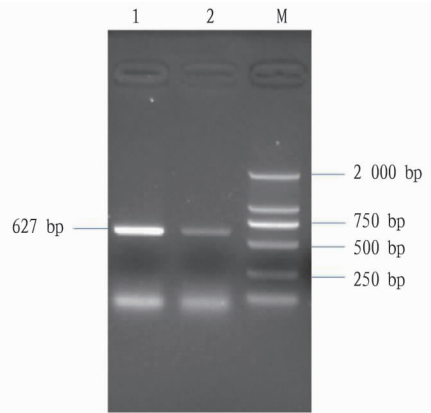


图 2 马铃薯 PLRV 病毒 CP 基因扩增结果

Fig. 2 Amplification results of CP gene of potato PLRV virus

胞质^[3]。

2.4 同源性分析及进化树构建 利用分离得到的宁夏 PLRV 分离物 CP 基因序列, 结合 NCBI 中报道国内分离得到的 PLRV CP 序列, 通过 DNAMAN 7.0 软件分析它们之间的序列同源性, 结果见表 1。由表 1 可知, 分离得到的宁夏分离物与 2013 年内蒙古分离物 (KC456052) 最为接近, 同源性达 99.8%; 与 2009 年内蒙古分离物 (FJ859027) 同源性最远, 达 98.7%。

PLRV CP 进化树由 MEGA5 软件分析, 利用最大似然统计模型构建进化树, 结果见图 4。由图 4 可知, 国内分离物大致可以分为 3 类: KC456052、FJ859027、KC456053、FJ859019、FJ859023、FJ859017、FJ853190、DQ309064、FJ859024 为第 1 类; FJ853189、KC456054、EF063711 为第 2 类; FJ859014、FJ859015、FJ859018、FJ859021、FJ853193、FJ853191、FJ859020、FJ853192 为第 3 类, 宁夏分离物与这 3 类分离物关系较远, 推测这类分离与国内这些地区的起源不同, 属于独立的支系。

3 讨论

在马铃薯脱毒生产中, 《马铃薯脱毒种薯》(GB 18133, 2000) 规定需检测的 5 种病毒分别为 PVS、PLRV、PVX、PVY 和 PSTVd, 是在我国广大马铃薯产区危害严重、发生普遍的 5 种病毒。

(1) PLRV 属于马铃薯黄症病毒组, 马铃薯卷叶病毒为直径约 26 nm 的六边形等轴粒子, 主要是由蚜虫以非持久性方式传播。初次侵染的植株, 其典型症状是幼叶褪绿、卷曲, 一些品种可能产生红晕, 尤其是小叶边缘。继发性侵染的植株通常矮化, 卷曲的叶片表现为直立、干燥和革质化^[1,4]。

(2) 目前, 对 PLRV 的检测有目测法、指示植物鉴别法、免疫检测法等, 但存在准确度不高、假阳性等问题。建立分子生物学检测法是可靠的病毒鉴定方法, 关于该病毒的研究和鉴定已有相关报道^[5-11]。高彦萍等^[12-13] 已经建立并优化了 PLRV 反转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) 检测体系。陈兆贵等^[14] 建立了马铃薯卷叶病毒实时荧光定量 PCR 检测技术。PLRV 也经常从脱毒种苗中检出^[15], 原原种中成为危害严重的病害^[16]。聂峰杰等^[17] 对宁夏马铃薯成熟期 PLRV 进行检测, 发现检出率达 34%, 且广泛种植的 6 个马铃薯品种均为感病品种。该研究在免疫检测法的基础上, 分离了 PL-

RV 宁夏分离物,建立了分子生物学方法,同时,分析了 PLRV 宁夏分离物的进化关系。

```

          10      20      30      40      50      60
1  ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGAAGGCCGA
1  M S T V V V K G N V N G G V Q Q P R R R
          70      80      90      100     110     120
61 AGAAGGCAATCCCTTCGCAGGCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCC
21 R R Q S L R R R A N R V Q P V V M V T A
          130     140     150     160     170     180
121 CCTGGGCAACCCAGGCGCCGAAGACGCAGAAGAGGAGGCAATCGCCGCTCAAGAAGAACT
41 P G Q P R R R R R R R R G G N R R S R R T
          190     200     210     220     230     240
181 GGAGTTCCCCGAGGACGAGGCTCAAGCGAGACATTCTGTGTTTACAAAGGACAACCTCATG
61 G V P R G R G S S E T F V F T K D N L M
          250     260     270     280     290     300
241 GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCCGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAAG
81 G N S Q G S F T F G P S L S D C P A F K
          310     320     330     340     350     360
301 GATGGAATACTCAAGGCCTACCATGAGTATAAGATCACAAGCATCTTACTTCAGTTCGTC
101 D G I L K A Y H E Y K I T S I L L Q F V
          370     380     390     400     410     420
361 AGCGAGGCCTCTCCACCTCCTCCGGCTCCATCGCTTATGAGTTGGACCCCATGCAAA
121 S E A S S T S S G S I A Y E L D P H C K
          430     440     450     460     470     480
421 GTATCATCCCTCCAGTCCCTACGTCAACAAGTTCCAAATTACGAAGGGCGGCGCCAAAACT
141 V S S L Q S Y V N K F Q I T K G G A K T
          490     500     510     520     530     540
481 TATCAAGCGCGGATGATAAACGGGGTAGAATGGCAGCAGTCTTCTGAGGATCAGTGCCGG
161 Y Q A R M I N G V E W H D S S E D Q C R
          550     560     570     580     590     600
541 ATACTGTGGAAGGGAAATGGAAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATC
181 I L W K G N G K S S D T A G S F R V T I
          610     620
601 AGGGTGGCTTTGCAAAACCCCAAATAG
201 R V A L Q N P K *
    
```

注:ATG 表示起始密码子;TAG 表示终止子;阴影标记氨基酸为核定位信号蛋白

Note:ATG is the start codon;TAG is the terminator;shadow labeled amino acid is the nuclear localization signal protein

图3 马铃薯 PLRV 病毒 CP 基因序列与推导氨基酸

Fig.3 CP gene sequence and deduced amino acids of potato PLRV virus

表1 宁夏分离物 PLRV CP 基因序列与国内分离物 CP 核苷酸序列同源性

Table 1 Homology of sequence of PLRV CP gene of Ningxia and CP nucleotide of domestic isolates

登陆号 Landing number	年份 Year	省份 Province	同源性 Homology//%	登陆号 Landing number	年份 Year	省份 Province	同源性 Homology//%
KC456053	2013	河北	99.7	EF063711	2006	贵州	99.5
DQ309064	2005	云南	99.4	FJ859014	2009	贵州	99.5
KC456054	2013	云南	98.9	FJ859018	2009	贵州	98.9
FJ859023	2009	云南	99.7	FJ853192	2009	贵州	99.0
FJ859015	2009	贵州	99.0	FJ853191	2009	贵州	99.5
FJ859021	2009	云南	99.4	FJ853190	2009	贵州	99.5
FJ859020	2009	云南	99.4	FJ853189	2009	贵州	99.0
FJ859019	2009	云南	99.7	KC456052	2013	内蒙古	99.8
FJ859017	2009	贵州	99.4	FJ859027	2009	内蒙古	98.7
FJ853193	2009	云南	99.2	FJ859024	2009	内蒙古	99.4

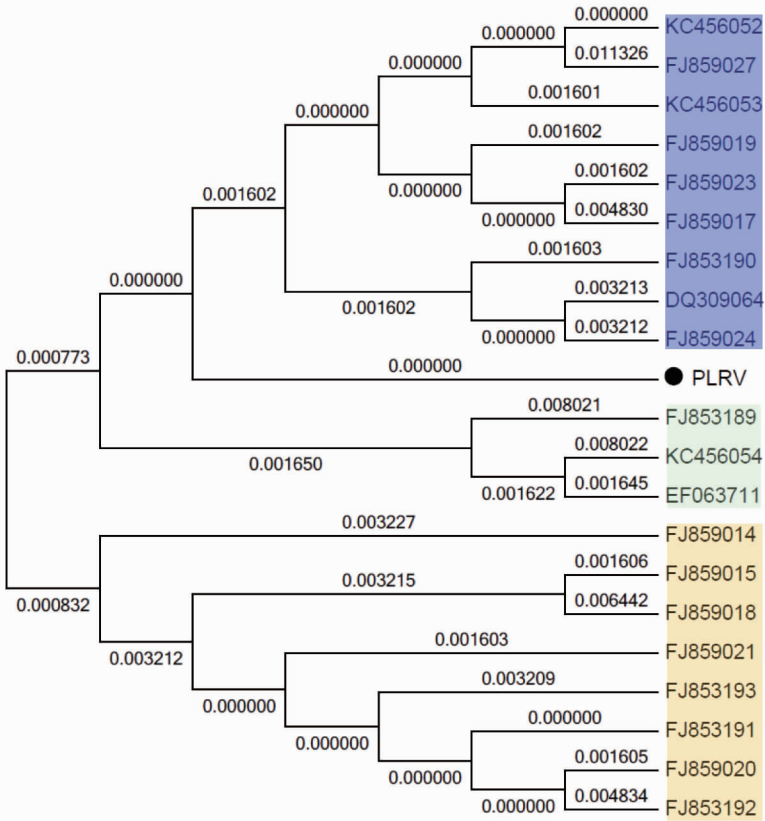


图 4 PLRV CP 进化树构建

Fig. 4 Construction of PLRV CP evolutionary tree

(3)南相日等^[18]利用植物表达载体构建了马铃薯卷叶病毒 CP 蛋白基因,并获得了转基因植株,表现出较强的抗卷叶病特性。因此,了解宁夏地区流行的 PLRV 对于利用基因工程培育抗病马铃薯新品种有一定的理论意义。

参考文献

[1] 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒(PLRV)基因组研究进展[J]. 中国病毒学, 1996(1): 1-8.
 [2] 宁夏回族自治区统计局, 国家统计局宁夏调查总队. 宁夏统计年鉴 2019[M]. 北京: 中国统计出版社, 2019.
 [3] LI X J, HALPIN C, RYAN M D. A novel cleavage site within the potato leafroll virus P1 polyprotein [J]. Journal of general virology, 2007, 88: 1620-1623.
 [4] 郑世玲, 刘作易. 马铃薯卷叶病毒(PLRV)检测及系统进化关系的研究进展[J]. 种子, 2007, 26(2): 49-51.
 [5] 颜永杰, 吴宽, 张珏, 等. 马铃薯卷叶病毒陕西分离物外壳蛋白(CP)的生物信息学分析[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2010, 40(3): 473-476.
 [6] 周云, 杨永智. 马铃薯卷叶病毒基因组保守序列片段的 RT-PCR 扩增[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2008, 26(2): 16-19.
 [7] 颜永杰, 吴宽, 谢海峰, 等. 陕西马铃薯卷叶病病原的分子生物学鉴定

[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(5): 87-92.
 [8] 吴兴泉, 谭晓荣, 陈士华, 等. 马铃薯卷叶病毒福建分离物的基因克隆与序列分析[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(4): 391-393.
 [9] 何心凤, 郭宝太, 李广存, 等. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因的 RT-PCR 扩增[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(4): 197-199.
 [10] 哈斯阿古拉, 施一染, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的合成、分子克隆和全序列分析[J]. 中国病毒学, 1992, 7(4): 432-435.
 [11] 丁铭, 方琦, 李婷婷, 等. 马铃薯卷叶病毒云南分离物外壳蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 植物病理学报, 2006, 36(5): 473-476.
 [12] 高彦萍, 吕和平, 张武, 等. 马铃薯卷叶病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 核农学报, 2020, 34(9): 1943-1950.
 [13] 高彦萍, 张武, 王国祥, 等. 马铃薯卷叶病毒 PLRV RT-LAMP 检测方法优化[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 259-264, 306.
 [14] 陈兆贵, 叶新友, 邢淑淇, 等. 马铃薯卷叶病毒实时荧光定量 PCR 检测技术研究[J]. 湖南农业科学, 2018(9): 9-12.
 [15] 张富荣, 戎素平, 张艳彦, 等. 马铃薯主要病毒病对种薯质量的影响[J]. 种子, 2019, 38(3): 97-99.
 [16] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 我国马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. 黑龙江农业科学, 2014(3): 68-72, 87.
 [17] 聂峰杰, 詹红, 张丽, 等. RT-PCR 技术对宁夏马铃薯脱毒种薯病毒检测的研究[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 188-193.
 [18] 南相日, 刘文萍, 刘琦, 等. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因克隆转化及其转基因后代的表达[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 106-109.

(上接第 61 页)

[7] 林焱, 杨瑜斌, 江灵辉, 等. 种植密度对丽芳西瓜营养代谢、生育及产量的影响[J]. 浙江农业科学, 2008, 49(2): 156-158.
 [8] 朱余清, 韩庆保, 崔素兰. 不同整枝方式对京欣 2 号西瓜产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 188-189.
 [9] 耿玉华, 赵纪连, 陈先南, 等. 西瓜新品种“抗病 948”不同密度与施肥量互作效应的研究[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 334-336.
 [10] 张桂兰, 徐小军, 李金荣. 不同灌溉和整枝方式对设施西瓜植株生长及果实性状的影响[J]. 中国瓜菜, 2016, 29(11): 49-52, 56.

[11] 徐志红, 徐永阳, 赵光伟, 等. 小果型西瓜大棚栽培不同整枝留果方式效应比较[J]. 中国瓜菜, 2010, 23(3): 32-34.
 [12] 杜志强, 王迪, 徐慧春, 等. 整枝方式对礼品西瓜品种农艺性状和产量的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2018(8): 44-47.
 [13] 王华, 林红梅, 张小锋. 沿海地区不同栽培密度对双大棚小果型西瓜综合效益的影响[J]. 中国瓜菜, 2015, 28(3): 43-45.
 [14] 李桂芬, 覃斯华, 陆宇明, 等. 不同栽培密度和整枝措施对大棚小型无籽西瓜综合效益的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2506-2510.
 [15] 徐德利, 杨静, 曹峰, 等. 优质小型西瓜拿比特长季节栽培技术规程[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(36): 12851-12853.