

芜菁花叶病毒吉林分离物外壳蛋白基因克隆与序列分析

王凤婷¹, 李琳², 孙玥¹, 祝富祥¹, 乔凯彬¹, 张祥辉¹, 潘洪玉¹, 刘金亮^{1*}

(1. 吉林大学植物科学学院, 长春 130062; 2. 吉林省农业广播电视学校, 长春 130599)

摘要:为明确芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)在吉林省十字花科蔬菜上的侵染情况, 用RT-PCR方法扩增获得吉林省16个TuMV病毒分离物的 cp 基因, 并对其序列进行分析。结果表明, 本研究所获得的16个吉林省TuMV分离物和2个山东省分离物 cp 基因序列同源性为90.3%~100%, 与其他30个从GenBank上获得的TuMV分离物核苷酸同源性为81.9%~99.3%。TuMV cp 基因系统进化分析显示:48个TuMV分离物分布在5个组, 吉林省TuMV分离物存在basal-B组和word-B组2个株系, basal-BR组为优势株系, 在Asian-BR、basal-B和OMS组中均无分布。重组分析表明, 吉林省16个TuMV病毒分离物 cp 基因都未发生重组事件。选择压力分析显示 cp 基因编码区处于负向或纯化选择压力。

关键词:吉林省; 芜菁花叶病毒; cp 基因; 系统进化; 序列分析

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)05-0071-05

Cloning and Aeqence Analysis of cp Gene of *Turnip mosaic virus* Isolates in Jilin Province

WANG Fengting¹, LI Lin², SUN Yue¹, ZHU Fuxiang¹, QIAO Kaibin¹, ZHANG Xianghui¹, PAN Hongyu¹,

LIU Jinliang^{1*}

(1. College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun 130062; 2. Jilin Agricultural Radio and Television School, Changchun 130599, China)

Abstract: In order to identify *Turnip mosaic virus* (TuMV) infection in cruciferous vegetables in Jilin province, 16 TuMV virus isolates cp genes were cloned. Sequence analysis results showed that the cp gene sequence identities of 16 TuMV isolates from Jilin province and 2 isolates from Shandong Province obtained in this study was 90.3%–100%, and the nucleotide identities of the 16 TuMV isolates obtained in this study was 81.9%–99.3% compared with other 30 TuMV isolates in GenBank. Phylogenetic analysis showed that 48 of the TuMV isolates including 16 isolates in Jilin Province, could be divided into 5 lineages. TuMV isolates in Jilin province were divided into 2 lineages corresponding to basal-B and word-B. Basal-B was the dominant isolates. But there was no isolates divided into the Asian-BR, basal -B and OMS lineages. The recombinant analysis of cp gene coding region of 18 TuMV isolates obtained in this study found that no recombinant phenomenon occurred. The results of selective pressure analysis showed that cp coding region was under negative or purified selective pressure, in which the selection pressure of the isolates in Asian-BR lineage was low, and that of the isolates in World-B lineage was the highest.

Key words: Jilin Province; *Turnip mosaic virus*; cp gene; Phylogenetic evolution; Sequence analysis

芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)属于马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)^[1-2], 具有广泛的寄主范围, 目前已成为危害蔬菜最严重的病毒之

一^[3]。TuMV通过多聚蛋白策略和核糖体移码策略加工成11个成熟蛋白^[4]。

TuMV容易发生变异, 具有多种变异类型。自1935年Hoggan等^[5]首次研究TuMV株系分化以来, 陆续报道TuMV株系分化结果, 但TuMV株系的遗传关系依然不明确。 $p1$ 、 cp 基因及3'-UTR等基因序列越来越多地用于TuMV株系遗传分化研究中^[6]。直至2002年, Ohshima等^[7]首次利用生物学与分子生物学手段将世界范围的TuMV分离物

收稿日期: 2020-10-30

基金项目: 吉林省重点研发计划项目(20210202131NC); 国家自然科学基金项目(31201485)

作者简介: 王凤婷(1978-), 女, 高级实验师, 博士, 主要从事蔬菜病害研究。

通讯作者: 刘金亮, 男, 博士, 教授, E-mail: jlliu@jlu.edu.cn

归为 BR 型和 B 型两个致病型,并划分为 Asian-BR、basal-B、basal-BR 和 world-B 4 个组。TuMV 可能是 1 000 年前由兰花中分离获得的 TuMV-OM 偏离进化形成的^[8],因此将这些分离物单独划为 OMs 组。Tian 等^[9]首次发现 TuMV basal-BR 组分离物在中国存在。

为明确 TuMV 在吉林省十字花科蔬菜上的侵染情况,本研究利用分子生物学手段,将采自吉林省的大白菜、萝卜疑似 TuMV 样品进行 *cp* 基因的克隆与测序,并进行重组分析系统进化关系,确定归属地位,明确种群选择压力,有助于深入理解 TuMV 种群遗传结构、进化规律及致病力等,为进一步揭示 TuMV 种群遗传变异规律及其致病机制奠定基础,同时为抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从吉林省、山东省十字花科蔬菜上采集具有典型 TuMV 侵染症状的样品,经过单斑分离后获得 18 个 TuMV 分离物,保存至-80 ℃冰箱。

RNA 提取试剂盒、M-MLV 逆转录酶、pMD18-TVector、*rTaq*DNA 聚合酶购自大连宝生物公司;琼

脂糖凝胶回收试剂盒、*Trans*2K DNA 分子量标准、T4 DNA 连接酶均购自北京全式金生物公司。其他生化试剂都是进口或国内分析纯。

1.2 RNA 提取与 RT-PCR 扩增

根据 GenBank 中 TuMV 全基因组序列,设计扩增 TuMV*cp* 基因序列与 3'-UTR 的引物对(TuMV-CP-F: 5'-CCTTACATAGCGGAAACAGCGCTGAGGAA-3'; UTR-R: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCCC TTGCATCCTATCAAATG-3')。利用 RNA 提取试剂盒提取感病样品总 RNA,以此为模板合成其 cDNA,再利用 TuMV-CP-F 和 UTR-R 扩增 *cp* 与 3'-UTR 片段^[10]。

1.3 基因克隆与测序

PCR 产物连接至 pMD18-TVector 上,转化大肠杆菌 DH5 α ,经 PCR 与酶切鉴定获得重组质粒。选择 2~4 个含有重组质粒的菌株送上海生工有限公司测序。

1.4 序列分析

1.4.1 序列同源性分析

用 DNASTAR 软件对片段序列拼接,登录 NCBI 网站,利用 Blast 检索确定是 TuMV*cp* 与 3'-UTR 序列,利用 DNASATR 软件对所获得的序列进行同源性比较(表 1)。

表 1 TuMV 分离物基本信息

登录号	分离物	寄主	地域	致病型
AB093622	2J	<i>Brassica pekinensis</i>	Japan	BR
AB093620	59J	<i>Raphanus sativus</i>	Japan	BR
HQ446217	BJ-C4	Unknown	China	Unknown
AB093601	Cal1	<i>Calendula officinalis</i>	Italy	BR
AB252103	CH6	<i>Raphanus sativus</i>	China	BR
AB093626	CHN1	<i>Brassica</i> sp.	China	BR
AB701701	DEU4	<i>Lactuca sativa</i>	Germany	BR
AB093623	DMJ	<i>Raphanus sativus</i>	Japan	BR
AB701705	Eru1D	<i>Eruca sativa</i>	Italy	B
AB701696	GK1	<i>Matthiola incana</i>	Greece	B
AB093602	IS1	<i>Allium ampeloprasum</i>	Israel	B
AB701721	ITA2	<i>Cheiranthus cheiri</i>	Italy	BR
AB701725	ITA8	<i>Abutilon</i> sp.	Italy	BR
KM094174	JPN 1	<i>Raphanus sativus</i>	Japan	Unknown
AB093605	KEN1	<i>Brassica oleracea</i>	Kenya	B
AB252124	KWB778J	<i>Brassica oleracea</i>	Japan	B
AB252130	ND10J	<i>Raphanus sativus</i>	Japan	BR
AB701727	NLD2	<i>Brassica oleracea</i>	Netherlands	B
AB701690	OM	<i>Orchis militaris</i>	Germany	DI*
AB701691	OMA	<i>Orchis militaris</i>	Germany	DI
AB701692	ORM	<i>Orchis morio</i>	Germany	(B)

续表 1

登录号	分离物	寄主	地域	致病型
AB701693	OS	<i>Orchis simia</i>	Germany	DI
AB093603	PV0104	<i>Lactuca sativa</i>	Germany	BR
AB105134	Tu-3	<i>Brassica oleracea</i>	Japan	B
AB362513	TUR9	<i>Raphanus sativus</i>	Turkey	B(R)
AF169561	UK1	<i>Brassica napus</i>	UK	B
AB701741	USA6	<i>Raphanus sativus</i>	USA	BR
EU734434	WFLB06	<i>Raphanus sativus</i>	China	BR
AF530055	YC5	<i>Zantedeschia</i> sp.	China	BR
KF246570	ZH1	<i>Phalaenopsis</i> sp.	China	Unknown
KR153038	CCLB	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
KR153039	LWLB	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
KR153040	WFLB14	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314859	WRJCL09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314850	GRJCL09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314854	RRHD10	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314847	CCJSL10	<i>Brassica pekinensis</i>	China	Unknown
JF314860	WRJCL10	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314848	GRJCJ09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314857	WRJCJ09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314855	RRJCJ09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314852	PRJCJ09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314853	PRJCJ09.1	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314858	WRJCK09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314849	GRJCK09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314846	CCJCJ09	<i>Brassica pekinensis</i>	China	Unknown
JF314856	RRJN09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown
JF314851	PRJCC09	<i>Raphanus sativus</i>	China	Unknown

注: DI 为不能够侵染芸薹属植物。LWLB 和 WFLB14 为山东省的 2 个 TuMV 分离物, CCLB、WRJCL09、GRJCL09、RRHD10、CCJSL10、WRJCL10、GRJCJ09、WRJCJ09、RRJCJ09、PRJCJ09、PRJCJ09.1、WRJCK09、GRJCK09、CCJCJ09、RRJN09、PRJCC09 为吉林省的 16 个 TuMV 分离物

1.4.2 系统进化分析

首先选择 2 个日本山药花叶病毒(*Japanese yam mosaic virus*, JYMV)分离物作为外组分离物, 利用 MEGA 7.0 软件 CLASTAL W 方法对序列进行比对, 再利用 NJ 法构建系统进化树^[10]。

1.4.3 重组分析

利用 RDP 4 软件分析重组, 该软件包括 BootScan、Chimaera 等方法, 至少 3 种方法分析结果为重组, 且 $P<1.0\times10^{-6}$, 才能确定存在重组事件^[10]。

1.4.4 遗传距离与选择压力分析

依据 *cp* 基因序列, 分别利用 MEGA 7.0 软件 K2P 法和 PBL 法计算 TuMV 分离物的遗传距离和选择压力。通过 d_N/d_S 值(非同义突变/同义突变)预测 *cp* 基因的选择压力^[10]。

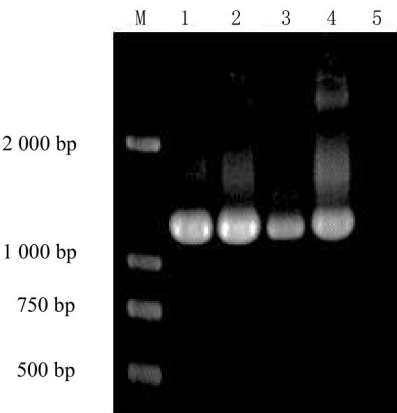
2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 扩增结果显示, 3 个 TuMV 分离物 RT-PCR 扩增产物大小均约为 1.2 kb, 与预测的片段理论大小一致(图 1)。

2.2 *cp* 基因序列同源性分析

利用 DNASTAR 软件中 Megalign 方法分析结果显示, 18 个 *cp* 基因的核苷酸序列同源性在 90.3%~100%, 不同寄主上的 TuMV 分离物没有明显寄主关联性。本研究中 18 个 TuMV 分离物与中国 BJ-C4 分离物(登录号: HQ446217)的核苷酸序列相似性最高, 同源性高达 99.3%; 与德国 OMA 分离物(登录号: AB701691)的核苷酸序列同源性最低, 仅为 81.9%。



M: *Trans2K* DNA Marker; 1: 阳性对照;
2: CCLB; 3: LWLB; 4: WFLB14; 5: 阴性对照

图1 RT-PCR 扩增 *cp*-UTR 片段产物

2.3 系统进化分析

通过系统进化分析发现,TuMV 分离物形成 5 个进化簇,即 Asian-BR、basal-B、basal-BR、world-B 和 OMS 组(图 2),与张雅琦根据 *p3* 基因序列分析结果一致^[11],吉林省 TuMV 分离物分布在 word-B 组和 basal-B 组,多数分离物均划分到 basal-BR 组,没有分离物分布在 Asian-BR、basal-B 和 OMS 组中。由此说明 TuMV 分离物 basal-BR 组为吉林省优势株系。

2.4 重组分析

TuMV 分离物 *cp* 基因重组分析结果显示,本研究获得的 18 个 TuMV 分离物 *cp* 基因编码区均没有发生重组。

2.5 遗传距离分析

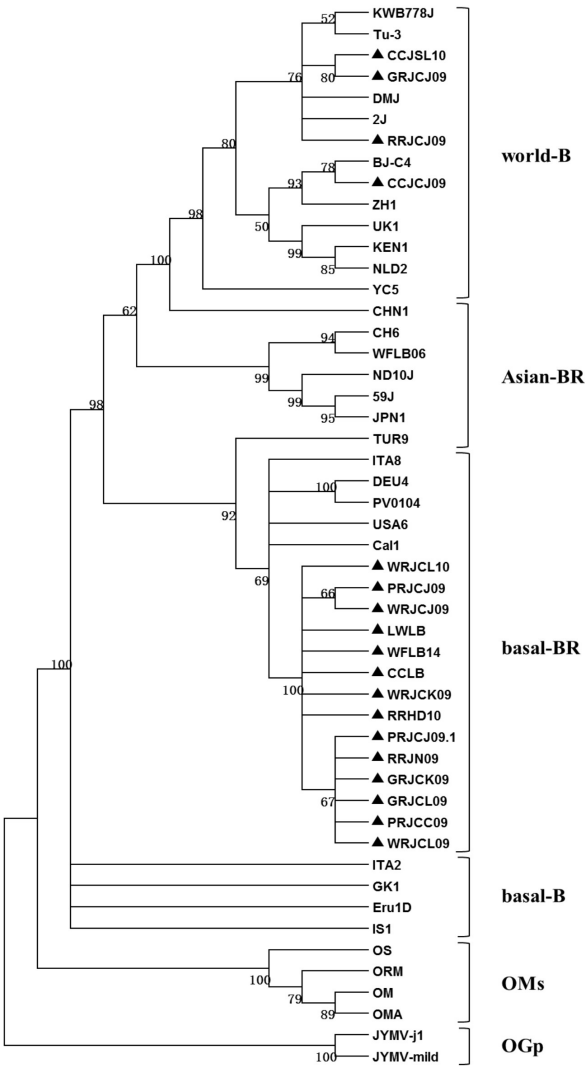
除 OMS 组外的 44 个 TuMV 分离物遗传距离分析结果表明(表 2),basal-B 组分离物(包括本研究的 4 个)组内的遗传距离最大。basal-B 组与 world-B 和 Asian-BR 组组间遗传距离最大。4 个组的组间遗传距离均大于组内,由此表明依据 *cp* 基因序列确定的分组结果合理^[110-111]。

表2 各组间和组内遗传距离

分组	basal-B	world-B	Asian-BR	basal-BR
basal-B	0.096±0.008			
world-B	0.121±0.010	0.023±0.003		
Asian-BR	0.121±0.010	0.089±0.009	0.034±0.004	
basal-BR	0.113±0.009	0.101±0.010	0.076±0.008	0.025±0.003

2.6 选择压力分析

为明确 TuMV 分离物的突变规律,对 Asian-BR、basal-B、basal-BR、world-B 组的 44 个分离物的 *cp* 基因遗传变异进行分析。结果显示,所有组



注:仅显示大于 50% 的 Bootstrap 值,隐藏小于 50% 的节点。分离物名称前带有“▲”符号为吉林省和山东省 18 个 TuMV 分离物

图2 TuMVcp 基因核苷酸序列构建系统进化树

的组内、组间的 $d_N/d_S < 1$,由此表明 *cp* 基因编码区承受负向或纯化选择压力。Asian-BR 组分离物承受较低的选择压力(d_N/d_S 为 0.065),world-B 组分离物承受较大的选择压力(d_N/d_S 值为 0.102)(表 3)^[110]。

表3 TuMV 各分离物 cp 基因编码区核苷酸多样性

分组	basal-B	world-B	basal-BR	Asian-BR
basal-B	0.071			
world-B	0.078	0.102		
basal-BR	0.068	0.071	0.080	
Asian-BR	0.075	0.058	0.053	0.065

3 结论与讨论

TuMV 是危害十字花科蔬菜最严重的病毒之一,中国存在 Asian-BR、basal-BR 和 world-B 组的分离物。TuMVbasal-BR 组分离物在中国呈现蔓

延趋势^[9,12-16]。根据 *cp* 基因核苷酸序列比较分析,本研究获得的吉林省 16 个 TuMV 分离物分布在 basal-BR 组和 world-B 组,且 basal-BR 组为吉林省 TuMV 分离物优势株系。根据 *p3* 基因序列分析结果显示吉林省长春市的 10 个 TuMV 分离物均属于 basal-BR 组^[17]。在中国各地区 TuMV 优势株系存在差异,如四川省仅发现有 TuMVworld-B 组分离物^[18],重庆市 TuMV 萝卜分离物均分布在 basal-BR 和 world-B 组,且 world-B 组为优势株系^[19],贵州省 basal-BR 为侵染甘蓝的优势株系^[14],而 Asian-BR、basal-BR 和 world-B 组的 TuMV 分离物在山东省均有分布^[13,16]。

在 TuMV 进化过程中普遍存在重组现象。本研究获得的 TuMV 分离物 *cp* 基因编码区都未发生重组,但 WFLB06 分离物在依据 *cp* 基因和全基因组序列构建的系统进化树中分别分布在 Asian-BR 组和 basal-BR 组中,出现这一结果的原因是 WFLB06 分离物存在 basal-BR 与 Asian-BR 组间的重组^[20]。

TuMV 全基因组或部分基因组序列不断增加为综合分析中国 TuMV 种群的遗传变异提供数据支撑。本研究结果有助于进一步明确 TuMV_{*cp*} 基因的分子变异及 TuMV 种群遗传规律,对深入研究该病毒的致病机制及培育 TuMV 病毒持久抗性的作物品种奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Wylie S J, Adams M, Chalam C, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae[J]. Journal of General Virology, 2017, 98: 352-354.
- [2] Fauquet M C, Mayo M A. Abbreviations for plant virus names - 1999 [J]. Archives of Virology, 1999, 144(6): 1249-1273.
- [3] Walsh J A, Jenner C E. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance[J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3: 289-300.
- [4] Chung B Y, Miller W A, Atkins J F, et al. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105: 5897-5902.
- [5] Hoggan I M É A, Johnson J. A Virus of Crucifers and other Hosts[J]. Phytopathology, 1935, 25(6): 640-644.
- [6] Van der Vlugt R A, Leunissen J, Goldbach R. Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3' nontranslated regions [J]. Archives of Virology, 1993, 131: 361-375.
- [7] Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, et al. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread[J]. Journal of General Virology, 2002, 83: 1511-1521.
- [8] Nguyen H D, Tomitaka Y, Ho S Y W, et al. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago [J]. PloS one, 2013, 8(2): e55336.
- [9] Tian Y P, Zhu X P, Liu J L, et al. Molecular characterization of the 3'-Terminal region of Turnip mosaic virus isolates from Eastern China[J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155: 333-341.
- [10] 祝富祥. 芜菁花叶病毒的分子变异及其 P3 蛋白在病毒与寄主互作中的功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [11] 张雅琦. 芜菁花叶病毒 *p3* 基因的分子变异及 P3 蛋白与拟南芥 AtSWEET1 蛋白的互作研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [12] Zhu F X, Sun Y, Wang Y, et al. Molecular characterization of the complete genome of three Basal-BR isolates of Turnip mosaic virus infecting *Raphanus sativus* in China [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17: 888.
- [13] Li X D, Zhu T S, Yin X, et al. The genetic structure of Turnip mosaic virus population reveals the rapid expansion of a new emergent lineage in China[J]. Virology Journal, 2017, 14: 165.
- [14] 刘学辉, 李 淳, 陈小均, 等. 侵染贵州甘蓝的芜菁花叶病毒 CP 基因序列分析[J]. 广东农业科学, 2020, 47(4): 99-105.
- [15] 吴 斌, 张 眉, 姜珊珊, 等. 大白菜、萝卜芜菁花叶病毒系统进化及 CP 序列分析[J]. 山东农业科学, 2018, 50(8): 100-105.
- [16] 张成玲, 赵永强, 杨冬静, 等. 不同寄主植物上芜菁花叶病毒外壳蛋白基因克隆及分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 37-41.
- [17] 张雅琦, 祝富祥, 王凤婷, 等. 芜菁花叶病毒长春分离物 *p3* 基因的克隆、序列分析及 P3 蛋白抗血清的制备[J]. 植物病理学报, 2015, 45(6): 585-591.
- [18] 蒋 彧, 席德慧, 王建辉, 等. 芜菁花叶病毒四川分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2010, 47(3): 639-643.
- [19] 熊 艳, 孙 森, 向华丰, 等. 重庆市萝卜芜菁花叶病毒的检测与序列分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(3): 432-438.
- [20] Wang H Y, Liu J L, Gao R, et al. Complete genomic sequence analyses of Turnip mosaic virus basal-BR isolates from China [J]. Virus Genes, 2009, 38: 421-428.

(责任编辑:王 昱)