

文章编号: 1674-7054(2016)02-0265-05

侵染胡椒的黄瓜花叶病毒海南分离物 全序列分析及亚组鉴定

刘培培^{1,2}, 车海彦², 曹学仁², 杨毅², 罗大全²

(1. 海南大学 环境与植物保护学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘 要: 对侵染海南胡椒的3个黄瓜花叶病毒分离物(CMV-WN1, CMV-DA, CMV-FT)的全序进行克隆和分析。CMV-WN1, CMV-DA, CMV-FT分离物RNA1全长分别为3 361, 3 360, 3 359个核苷酸(nt), 编码1a蛋白; RNA2全长分别为3 044, 3 048, 3 046 nt, 编码2a和2b蛋白; RNA3全长分别为2 217, 2 224, 2 216 nt, 编码3a和CP蛋白。序列一致性比较结果表明, CMV-WN1, CMV-DA, CMV-FT的RNA1, RNA2, RNA3均与CMV亚组IB CMV-SD序列一致性最高, 编码的所有蛋白的氨基酸序列一致性也均与CMV-SD序列一致性最高, 其中除了2b氨基酸序列一致性低于90%外, 其他蛋白的氨基酸序列的一致性均高于93.5%。RNA3的5'NTR结构分析以及RNA3 5'NTR核苷酸序列和CP氨基酸序列系统进化树分析结果表明CMV-WN1, CMV-DA及CMV-FT均属CMV IB亚组。CP系统进化树中CMV-WN1, CMV-FT与云南胡椒分离物CMV-YNP聚成一簇, 而CMV-DA与海南胡椒分离物CMV-HNP独立形成另一个分支。

关键词: 胡椒; 黄瓜花叶病毒; 海南分离物; 核酸; 全序列分析

中图分类号: S 432.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.021

胡椒(*Piper nigrum* L.)是热带地区的香辛料作物,在医学和食品生产中都有广泛用途^[1]。海南是我国胡椒的主产地,据2015年海南农业厅统计海南胡椒的种植面积约2.13 hm²(32万亩),年总产量超过4万t。由黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)引起的胡椒花叶病是胡椒生产中的重要病害之一,国内外胡椒种植区均有发生^[2]。通过CP基因序列分析, Bhat A I等^[3]鉴定印度胡椒分离物CMV-India属于亚组I成员; 牛立霞等^[4]发现海南分离物CMV-China与CMV-India一致性相对较低,应属不同株系; 刘向阳等^[5]证明云南分离物CMV-YNP与从不同地域感病胡椒中分离的其他CMV株系虽同属CMV IB亚组,但存在较大差异。CMV基因组在不同地域、寄主上变异较大,各亚组株系的地理分布不同,在寄主上产生的症状亦不同,造成的损失也不尽相同^[6]。笔者2014年在海南的琼海、文昌、海口、万宁、定安等胡椒主栽区进行田间初步调查时发现,各调查区均有胡椒花叶病发生,且大部分胡椒园发病率约为10%,发病率最高的可达44.4%,显然胡椒花叶病已成为影响海南胡椒产业发展的一个重要限制因素。因为目前没有直接有效的防治胡椒花叶病的方法,为此笔者试图通过对海南胡椒CMV分离物基因组进行全序列分析,并对海南万宁、定安、琼海3个地区的CMV胡椒分离物进行亚组类型鉴定,为进一步深入探究胡椒CMV的致病机理、寻找新的抗病毒策略,为胡椒花叶病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品 采自海南万宁、定安、琼海表现出花叶症状的胡椒叶片,样品编号为CMV-WN1, CMV-DA, CMV-FT,置于-80℃冰箱备用。

收稿日期: 2015-12-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(项目编号: 201303028)

作者简介: 刘培培(1990-),女,海南大学环境与植物保护学院2013级硕士研究生。E-mail: liu_pei2009@163.com

通信作者: 罗大全(1968-),男,研究员,从事植物病理学研究。E-mail: luodaquan@163.com

1.2 叶片总 RNA 的提取 采用天根 RNAprep Pure Plant Kit(DP441) 试剂盒提取胡椒总 RNA,方法参考试剂盒说明书。

1.3 CMV-WN1 RNA 链 cDNA 合成、克隆和鉴定 以提取的胡椒叶片总 RNA 为模板,使用 TransGen TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 进行基因组扩增,特异性引物 GSP 序列为 TGGTCTCCTT,提取方法参考试剂盒说明书。扩增条件为:94 ℃ 4 min 预变性;35 次扩增循环包括 94 ℃ 30 s 变性,55 ℃ 30 s 退火,72 ℃ 2 min 延伸;最后 72 ℃延伸 10 min。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段。目的片段与 PMD18-T Simple Vector 进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。经过蓝白斑筛选,挑取白色菌落,PCR 鉴定阳性克隆。引物信息参考金大伟等^[5]的基因组扩增引物。

1.4 序列测定与一致性比较 阳性克隆委托英潍捷基(广州)贸易有限公司进行测序。序列的拼接与一致性分析采用 DNASTAR 的 Editseq,ContigExpress 软件和 Megalign 软件。用于核苷酸序列一致性比较的 Cucumoviruses 株系分别为:CMV-SD(Af071551,d86330,ab008777),CMV-Fny(d00356,d00355,d10538),CMV-Q(X02733,X00985,m21464),花生矮化病毒 ER 株系(PSV-ER)(U15728,U15729,U15730),番茄不孕病毒 V 株系(TAV-V)(nc-003837,nc-003838,nc-003836)。

1.5 RNA3 5'NTRs 和 CP 结构分析 利用 DNAMAN 和 Clustal X 软件对 9 个 CMV 各亚组代表株系和 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 的 RNA3 5'NTRs 的核苷酸序列进行比较,分析其保守和非保守结构。MEGA 5.1 软件中的邻接算法(Neighbor-Joining,NJ) 分别构建 RNA3 5'NTR 和 CP 氨基酸序列的系统进化树。进化树构建中引入花生矮化病毒(*Peanut stunt virus*,PSV) ER 株系为外群。

所用的 CMV 株系及 GenBank 登录号分别为:IA ab042294,NT9 d28780,Y D12499,O d00385,KM ab004780,M d10539,Leg D16405,Ix U20219,Tfn Y16926,LS af127976,LY af198103,Trk7 L15336,Xb af268598,Kin Z12818,HB24 KC019301,LK AJ495841,Leg D16405,Cb7 EF216867,Phy DQ412732,NY EF216865,China EU926956,YNP JQ692129,HNP JQ895557,India AY545924,Ph EF424780,CaW EF424778。

2 结果与分析

2.1 基因组大小与结构 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 的 RNA1 全长分别为 3 361,3 360,3 359 nt (GenBank 登录号: KT004542,KU255784,KU255790),含有一个开放阅读框架(ORF) ORF1,编码 993 个氨基酸的 1 a 蛋白,编码区分别为 96 ~ 3 077,96 ~ 3 077,95 ~ 3 076 nt;CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 的 RNA2 全长分别为 3 044,3 048,3 046 nt(GenBank 登录号: KT004543,KU255785,KU255791),含有 ORF2 和 ORF3,编码 858 个氨基酸的 2 a 蛋白和 111 个氨基酸的 2 b 蛋白,2 a 蛋白编码区分别为 79 ~ 2 655,78 ~ 2 654,79 ~ 2 655 nt,2b 蛋白编码区分别为 2 414 ~ 2 749,2 413 ~ 2 748,2 414 ~ 2 749 nt;CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 的 RNA3 全长分别为 2 217,2 224,2 216 nt(GenBank 登录号: KT004544,KU255786,KU255792),含有 ORF4 和 ORF5,编码 279 个氨基酸的 3a 蛋白和 218 个氨基酸的 CP 蛋白,3a 蛋白编码区均为 122 ~ 961 nt,CP 蛋白编码区分别为 1 260 ~ 1 916,1 261 ~ 1 917,1 260 ~ 1 916 nt。

2.2 核苷酸、氨基酸序列一致性 将 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 分离物的 RNA1,RNA2,RNA3 核酸序列及编码蛋白的氨基酸序列与 CMV 各亚组代表株系 Fny(亚组 I A),SD(亚组 I B) 和 Q(亚组 II) 和 Cucumovirus 其他病毒 PSV-ER 和 TAV-V 进行一致性比对,结果见表 1-2。CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 分离物与其他分离物序列和编码蛋白一致性比较的结果显示:CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 与亚组 I 代表株系的一致性均远高于与亚组 II 株系的一致性;不同的蛋白一致性变化幅度各不相同,以 1a 变异幅度最小,2b 变异幅度最大。除了 2b 氨基酸序列一致性低于 90% 外,其他蛋白的氨基酸序列的一致性均高于 93.5%。无论是核苷酸序列一致性还是氨基酸序列一致性,CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 与 CMV IB 株系 CMV-SD 间的一致性略高于与亚组 IA 成员 CMV-Fny 间的一致性。

表 1 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 与 Cucumovirus 5 个株系 3 条链核苷酸序列一致率

Tab. 1 Sequence alignment of CMV-WN1, CMV-DA and CMV-FT RNAs with the counterparts of 5 strains of Cucumovirus

株系 Strain	核苷酸序列一致性/% Similarity of nucleotide sequence								
	RNA1			RNA2			RNA3		
	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT
CMV-Fny	91.8	91.1	91.8	90.4	89.6	90.5	91.2	89.3	90.9
CMV-SD	92.6	91.0	92.5	92.8	91.4	92.9	94.6	90.1	94.4
CMV-Q	76.1	76.0	76.1	69.3	69.8	69.4	72.1	72.3	72.1
PSV-ER	66.0	66.2	66.1	58.0	56.9	57.7	56.4	57.4	56.4
TAV-V	67.9	67.5	67.7	59.2	59.7	59.1	53.6	52.6	53.3

表 2 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 与 Cucumovirus 5 个株系 3 条链核苷酸编码的蛋白氨基酸序列的一致性比较

Tab. 2 Sequence alignment of amino acids of proteins encoding CMV-WN1, CMV-DA and CMV-FT RNAs with the counterparts of the 5 strains of Cucumovirus

株系 Strain	氨基酸序列一致性/% Similarity of amino acid sequences														
	1a			2a			2b			3a			CP		
	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT	WN1	DA	FT
CMV-Fny	96.5	96.0	97.6	93.5	90.9	93.2	81.2	81.2	80.4	95.0	93.9	93.5	97.2	97.2	97.7
CMV-SD	96.0	95.5	97.1	95.8	93.7	95.6	88.3	84.7	84.7	97.9	94.8	96.9	98.2	98.2	98.6
CMV-Q	83.5	84.7	84.9	73.8	73.2	73.5	47.4	47.0	47.3	82.4	82.8	81.4	80.9	81.8	81.4
PSV-ER	70.8	71.7	71.5	53.8	54.3	54.2	33.0	33.9	34.5	64.1	66.2	63.4	47.6	48.1	47.1
TAV-V	72.1	72.8	73.1	57.8	58.0	57.7	39.1	39.1	39.1	65.1	66.2	64.8	43.1	43.1	42.7

2.3 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 与 CMV 亚组代表株系 RNA3 5′NTRs 结构比较 利用 DNAMAN 和 Clustal X 软件对 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 和 9 个 CMV 各亚组代表株系的 RNA3 5′NTRs 的核苷酸序列进行比较,结果(图 1)表明,CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 在 RNA3 5′NTR 结构上与亚组 IB 株系结构特征相似,与 CMV 亚组 IA,II 株系结构上存在明显差异。

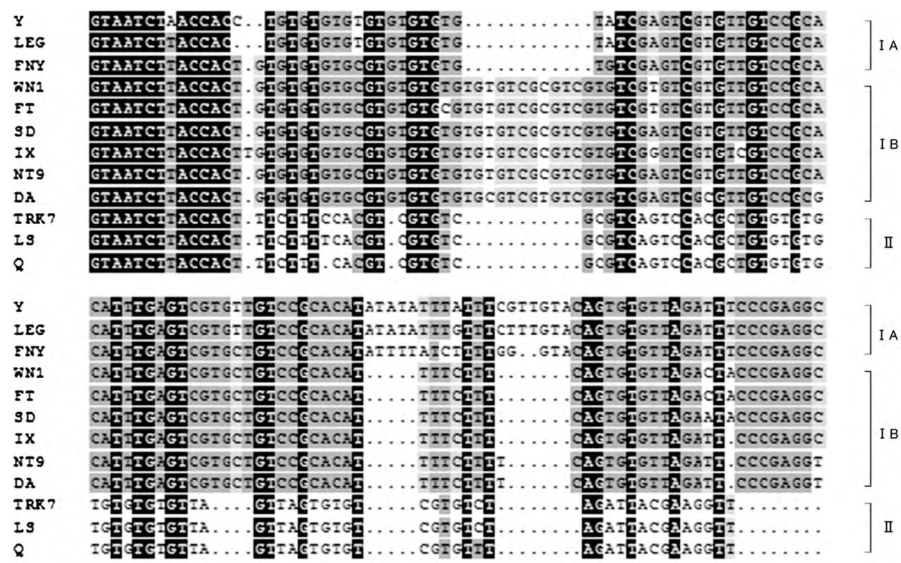


图 1 CMV 株系 RNA3 5′NTR 核苷酸序列进行结构比较

Fig. 1 Alignment of nucleotide sequence of 5′NTRs of CMV-WN1, CMV-FT and CMV-DA RNA3 with 9 other strains of CMV

2.4 RNA3 5′NTR 和 CP 序列系统进化树分析 根据目前公布的 CMV 各株系 RNA3 的 5′ NTR 核苷酸和 CP 氨基酸序列利用 MEGA 5.1 构建系统进化树(图 2-3)。通过 5′ NTR 核苷酸和 CP 氨基酸序列的系统进化树将 CMV-WN1,CMV-DA,CMV-FT 归为 CMV 亚组 I 的 IB。由 5′ NTR 核苷酸进化树可以看出

CMV-WN1, CMV-FT 与 SD 进化关系很近, CMV-DA 与 Tfn 及 NT 进化关系很近, CP 氨基酸序列的系统进化树表明, CMV-WN1, FT, YNP 进化关系很近; CMV-DA 与 HNP 进化关系很近。

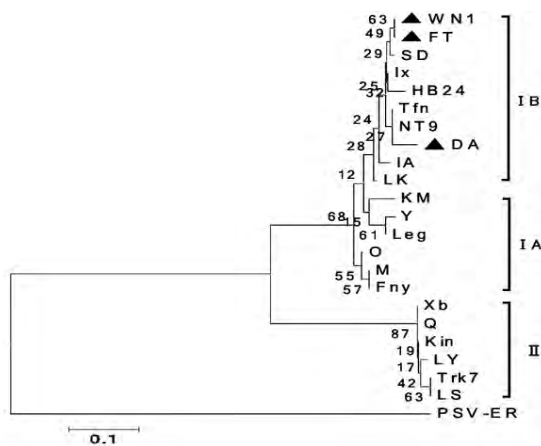


图2 RNA3 5' NTR 的核苷酸序列系统进化树

▲ 代表 3 个海南 CMV 胡椒分离物

Fig. 2 The phylogenetic tree of nucleotide sequence of RNA3 5' NTR

▲ presents 3 CMV isolates from the black pepper in Hainan

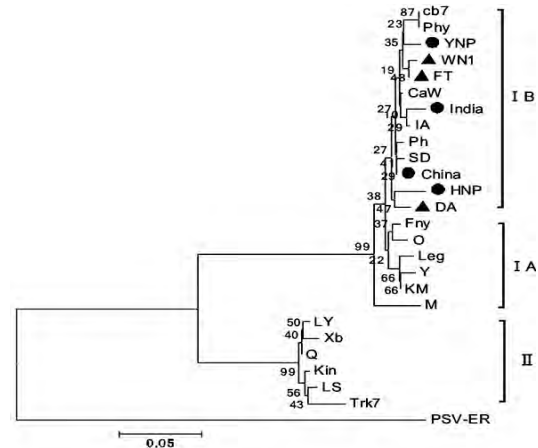


图3 CP 氨基酸序列的系统进化树

▲ 代表 3 个海南 CMV 胡椒分离物 ● 代表已报道的 CMV 胡椒分离物

Fig.3 The phylogenetic tree of amino acid sequence of CP
▲ indicates 3 CMV isolates from the black pepper in Hainan; ● indicates reported CMV isolates from the black pepper

3 讨论

黄瓜花叶病毒是雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*) 的典型成员, 为三基因组分、正链 RNA 病毒^[8], 是寄主范围最大、分布最广、对农作物危害最严重的植物病毒之一^[9]。黄瓜花叶病毒的 RNA1, RNA 2 分别编码和复制有关的 1a, 2a 蛋白^[10-11], 其中在 RNA2 上还存在着亚基因 RNA4A, 编码 2b 蛋白, 该蛋白决定 CMV 在寄主上的系统性侵染以及寄主范围, 同时抑制病毒介导的基因组沉默^[12-13]。黄瓜花叶病毒的 RNA3 编码 3a 移动蛋白和外壳蛋白^[14]。Palukaitis 等^[15] 根据寄主范围、症状反应、血清学以及 CP 序列差异将 CMV 分为亚组 I 和亚组 II。Roossinck 等^[16] 基于基因组 RNA3 的 5' 端的非编码区序列将亚组 I 进一步分为亚组 I A 和亚组 I B。大多数病毒株系有一定的地理分布, CMV 亚组 I 在热带和亚热带较常见, 而 CMV 亚组 II 在温带较为常见^[17]。CMV 的亚组 I A 和亚组 II 在全世界范围内都有分布, 而 CMV 亚组 I B 主要在亚洲地区^[17]。通过核酸序列一致性的比对与 RNA3 5' NTR 结构和 CMV CP 基因系统进化树的分析, 确定海南胡椒的 CMV 分离物 WN1、DA、FT 均属于 CMV 亚组 I B。

3 个侵染胡椒的 CMV 海南分离物编码的所有蛋白的氨基酸序列均与 CMV-SD 序列一致性最高, 但是 2b 蛋白的氨基酸序列一致性均低于 90%, 而其他蛋白的氨基酸序列的一致性均高于 93.5%, 这可能与本研究中的 3 个 CMV 分离物和 CMV-SD 的寄主不同, 而 2b 蛋白决定 CMV 的寄主范围有关^[17]。CMV CP 基因系统进化树分析结果为 CMV-WN1, CMV-FT 与已报道的云南胡椒分离物 CMV-YNP^[8] 聚成一簇; CMV-DA 与已报道的海南胡椒分离物 CMV-HNP^[8] 独立形成另一个分支, 与已报道的印度的 CMV 胡椒分离物^[18] 差异较大。CMV CP 基因系统进化树分析结果表明, 除了寄主外 CMV 的发生、进化、变异与地域等其他因素可能有关联, 这一推测与刘向阳等^[19] 的研究结果一致。在感染 CMV 的胡椒叶片上还检测到胡椒黄斑病毒(*Piper yellow mottle virus*, PYMV), 为此胡椒花叶病危害日趋严重是否与其混合侵染有关需进一步研究明确。全序列分析中 2b 蛋白的一致性最低, 可做系统性侵染、寄主范围和抑制病毒介导的基因组沉默方面的进一步研究分析。

参考文献:

- [1] 桑立伟, 谭乐和, 刘爱勤, 等. 海南省胡椒主要病害现状初步调查 [J]. 植物保护, 2010, 36(5): 133-137.
- [2] 张俊祥. 胡椒花叶病防治 [J]. 云南农业科技, 1984(4): 32-34.
- [3] Bhat A I, Hareesh P S, Madhubala R. Sequencing of coat protein gene of an isolate of Cucumber mosaic virus infecting black

- pepper (*Piper nigrum* L.) in India [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2005, 14: 37–40.
- [1] 牛立霞, 王健华, 冯团诚, 等. 海南胡椒中黄瓜花叶病毒分离物的分子鉴定 [J]. 热带作物学报, 2008, 29(4): 510–513.
 - [2] 刘向阳, 刘爱勤, 周琳. 云南胡椒花叶病病原检测及亚组鉴定 [J]. 河南农业大学学报, 2014, 48(1): 46–51.
 - [3] 王海燕. CMV 新株系的全基因组序列与寄主生物学研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2009.
 - [4] 金大伟, 罗朝鹏, 杨军, 等. 烟草黄瓜花叶病毒湖北分离物全基因组序列分析及亚组鉴定 [J]. 烟草科技, 2014, 318(1): 1–4.
 - [5] Mireille Jacquemond. Cucumber mosaic virus [M]. Adv. Virus Res, 2012: 439–504.
 - [6] Palukaitis P, Garcfa-Arenal F. Cucumoviruses [J]. Advances in Virus Research, 2003, 62(4): 241–323.
 - [7] S K Choi, J Y Yoon, T Canto, et al. Replication of cucumber mosaic virus RNA1 in cis requires functional helicase-like motifs of the 1a protein [J]. Virus Res, 2011, 158(1/2): 271–276.
 - [8] A Gal-On, T Canto, P Palukaitis. Characterisation of genetically modified cucumber mosaic virus expressing histidine-tagged 1a and 2a proteins [J]. Arch Virol, 2000, 145(1): 37–50.
 - [9] A Sunpapao, T Nakai, F Dong, et al. The 2b protein of cucumber mosaic virus is essential for viral infection of the shoot apical meristem and for efficient invasion of leaf primordia in infected tobacco plants [J]. J Gen Virol, 2009, 90(Pt 12): 3015–3021.
 - [10] Zhang L, Hanada K, Palukaitis P. Mapping local and systemic symptom determinants of cucumber mosaic virus in tobacco [J]. Journal of General Virology, 1994, 75(3): 3185–3191.
 - [11] L M Blackman, P Boevink, S S Cruz, et al. The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of nicotiana clevelandii [J]. Plant Cell, 1998, 10(4): 525–538.
 - [12] Pita J S, Roossinck M J. Mapping viral functional domains for genetic diversity in plants [J]. Journal of Virology, 2013, 87(2): 790–797.
 - [13] Roossinck M J, Zhang L, Hellwald K H. Rearrangements in the 5′nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaicvirus RNA3 indicate radim evolution of three subgroups [J]. Journal of Virology, 1999, 73(8): 6752–6758.
 - [14] Wang Y, Gaba V, Yang J. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts [J]. Phytopathology, 2002, 92(1): 51–58.
 - [15] Bhat A I, Hareesh P S, Madhubala R. Sequencing of Coat Protein Gene of an isolate of Cucumber mosaic virus Infecting Black Pepper (*Piper nigrum* L.) in India [J]. Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology, 2005, 14(1): 37–40.

Complete Sequence Analyses and Subgroup Identification of Cucumber Mosaic Virus Hainan Isolates Infecting *Piper nigrum* L. in Hainan Province

LIU Peipei^{1,2}, CHE Haiyan², CAO Xueren², YANG Yi², LUO Daquan²

¹ College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; ² Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: The full-length cDNA sequences of genomic RNAs of CMV-WN1, DA and FT isolates from the leaves of black pepper (*Piper nigrum* L.) infected with cucumber mosaic virus in Hainan Province were determined by using RT-PCR and sequence analysis. The RNA1 of the CMV-WN1, DA and FT consisted of 3361, 3360 and 3359 nucleotides (nt), respectively, and encoded protein 1a. The RNA2 consisted of 3044, 3048 and 3046 nt, respectively, and encoded protein 2a and 2b. The RNA3 contained 2217, 2224 and 2216 nt, respectively, and encoded protein 3a and CP. The CMV-WN1, DA and FT isolates had the highest similarity in the sequences of RNA 1, RNA2 and RNA3 with the CMV-SD strain, and their amino acid sequences of all encoding proteins were also most highly similar with that of the CMV-Strain, of which the amino acid sequence of all the proteins had a 93.5% similarity with that of the CMV-SD except that 2b amino acid sequence shared a similarity of 90% or less. Analysis of the 5′NTR structure of RNA3, the phylogenetic tree analyses of 5′NTR nucleotide sequences of RNA3 and CP amino acid sequences showed that the CMV-WN1, DA and FT isolates were classified into CMV IB subgroup. The phylogenetic tree analyses of CP amino acid sequences also showed that CMV-WN1, CMV-FT and the isolate of the black pepper in Yunnan, CMV-YNP, were clustered into the same group while the CMV-DA and the isolate of the black pepper in Hainan, CMV-HNP, were clustered into another separate group.

Keywords: *Piper nigrum* L.; Cucumber mosaic virus; Hainan isolates; nucleotide; complete sequence analysis