

草莓镶脉病毒 (SVBV) ORF I 基因的克隆及序列分析*

贾琳, 倪方锐, 李瑞, 蒋磊, 丁菲, 江彤**

安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036

摘要: 用 CTAB 法从感染草莓镶脉病毒 (SVBV) 的草莓叶片中提取总 DNA, 设计特异性引物扩增含有 SVBV ORF I 的片段, 克隆并测序。序列分析表明, 该片段全长 1 033 个核苷酸, 其中包含的 ORF I 全长 987 个核苷酸, 编码 328 个氨基酸。结果表明: 将其与花椰菜花叶病毒属其他成员的 ORF I 序列相比较, 中国 SVBV ORF I 与美国 SVBV ORF I 序列相似性最高, 达 88.3%。进一步构建 SVBV 及其同属其它成员 ORF I 的系统关系树, 结果显示, 中国 SVBV ORF I 与美国 SVBV ORF I 单独形成一个亚分支, 说明来源于草莓的 2 个 SVBV 亲缘关系最近。

关键词: 草莓镶脉病毒; ORF I; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.s.20101115.1451.001.html>

DOI: CNKI:22-1100/S.20101115.1451.001

Cloning and Sequence Analysis of Gene ORF I of *Strawberry vein banding virus* (SVBV)

JIA Lin, NI Fang-rui, LI Rui, JIANG Lei, DING Fei, JIANG Tong

School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: The total DNA was extracted from strawberry leaves infected with SVBV by CTAB method. Specific primer pair was designed to amplify the fragment including SVBV ORF I, and then the fragment was cloned and sequenced. Sequence analysis results showed that the fragment was consisted of 1 033 nts, including 987 nts of full-length ORF I gene encoding 328 amino acids. Comparing the sequence of SVBV ORF I with that of the ORF I of other members of *Caulimovirus*, the result showed that Chinese SVBV ORF I shared the highest sequence similarity (88.3%) with that of the American SVBV. A phylogenetic tree based on alignment of the nucleotide sequences of ORF I of SVBV and other members of *Caulimovirus* was constructed. The result indicated that the Chinese SVBV ORF I and the American SVBV ORF I clustered into a separate subgroup. It illustrated that the two SVBV derived from strawberry had the closest relationship.

Key words: *Strawberry vein banding virus*; ORF I; clone; sequence analysis

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30740033), 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (KJ2009A105, KJ2008A133)

作者简介: 贾琳, 女, 硕士研究生, 主要从事植物病毒学研究。

收稿日期: 2010-07-21 网络出版日期:

** 通讯作者

草莓镶脉病毒 (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) 是一种严重危害草莓的潜隐性病毒, 在世界各地尤其在南北美、欧洲、澳大利亚、日本等国家和地区广泛分布^[1-3]。目前, 关于SVBV在我国吉林、辽宁、河北、河南等省都有报道^[4-5], 它以半持久性方式通过蚜虫或嫁接传播^[6], 在栽培品种上的带毒率可达 21%, 已成为危害我国草莓生产的4种主要病毒之一^[4, 7]。

SVBV分类上属花椰菜花叶病毒科、花椰菜花叶病毒属 (*Caulimovirus*)^[8], 是一种粒子等轴状的双链DNA病毒^[9]。迄今为止, 全世界只测定了一个来自美国加州的SVBV分离物全长序列, 该基因组全长7 876 bp, 包含7个ORF, 可能编码7个大小不等的蛋白^[10]。其中, ORF I 编码的蛋白可能与病毒的胞间移动有关, ORF II 编码的蛋白可能与蚜虫传染有关, ORF III 可能编码一个非序列专化性的DNA结合蛋白, ORF IV 编码外壳蛋白 (CP), ORF V 编码逆转录酶蛋白, ORF VI 可能编码一个反式作用因子, 与病毒——寄主互作的专化性有关, ORF VII 编码的蛋白功能未知^[10]。

目前, 有关SVBV的研究报道极少, SVBV基因组各个ORF的功能研究至今尚无人涉及。本研究克隆了中国SVBV ORF I 序列, 并对其核苷酸序列进行初步分析, 为进一步研究SVBV ORF I 的具体功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病样、菌种及载体 感染SVBV的草莓病样由沈阳农业大学张志宏教授惠赠。转化受体大肠杆菌菌种DH5 α 由安徽农业大学植物病理实验室自备, 克隆载体pMD18-T购自大连宝 (TaKaRa) 生物工程有限公司。作为阳性对照的SVBV克隆质粒 (pSVBV-E3) 由美国内布加拉斯加大学 (University of Nebraska) Drake Stenger教授惠赠。

1.1.2 试剂 LA Taq DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶、DNA内切酶等工具酶购自大连宝 (TaKaRa)

生物工程有限公司; 琼脂糖电泳中所用的 DL2000 plus marker 购自北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司; 琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒与质粒小提试剂盒购自天根 (Tiangen) 生化科技 (北京) 有限公司。植物总DNA抽提试剂为安徽农业大学植物病理实验室自备。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取 草莓总DNA的提取采用CTAB法^[11]。

1.2.2 引物的设计与合成 根据GenBank已登录的美国SVBV ORF I序列两侧保守区设计1对特异性引物P1-F和P1-R, P1-F:

CATCTTCATCAACATCCCAG,

P1-R: GAGGTTGTCTTCTGAACTC, 引物由上海英潍捷基生物公司合成。

1.2.3 SVBV ORF I 的 PCR 扩增 以提取的草莓叶片总DNA为模板, 用引物 P1-F、P1-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 60s, 30 个循环。

1.2.4 PCR 产物的克隆 将 PCR 产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳, DNA 纯化回收试剂盒回收目的片断, 与 pMD18-T Vector 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 菌落 PCR 筛选阳性克隆。

1.2.5 序列测定和序列分析 阳性克隆送上海英潍捷基生物公司测序。利用软件 DNASTar 和 DNAMAN Version 5.22 进行序列处理、分析。多序列比较采用 DNASTar Clustal V 方法, 进化树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法 (Neighbor-joining)。用于序列比较和进化树构建的各个 *Caulimovirus* 分离物 ORF I 序列 GenBank 登录号见表 1。

2 结果与分析

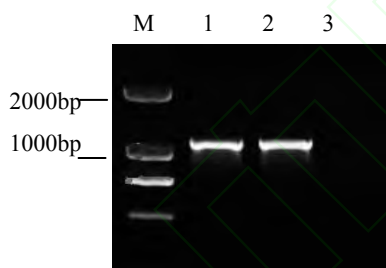
2.1 SVBV ORF I 的PCR扩增结果

以草莓植株总DNA为模板, 用特异性引物 P1-F、P1-R 进行 PCR 扩增, 可以得到 1 条略 >1 000 bp 的特异性条带 (图 1)。

表 1 花椰菜花叶病毒属各分离物 ORF I 序列 GenBank 登录号

Table 1. GenBank accession numbers of ORF I sequences of *Caulimovirus* isolates

分离物 Isolates	GenBank 登录号 GenBank accession numbers
BRRV-New Jersey	NC_003138
CaMV-Xinjiang	AF140604
CaMV-DH	M10376
CaMV-CMV-1	M90543
CaMV-G2	V00140
CaMV-B-S	V00141
CERV-Indian	AJ853858
CERV-pCE1	X04658
DaMV-Holland	EU090952
FMV	X06166
SVBV-China	FN689701
SVBV-USA	NC_001725



M. DL2000 Marker; 1. SVBV ORF I 片段 SVBV ORF I fragment; 2. 阳性对照 (pSVBV-E3) positive control; 3. 阴性对照 negative control

图 1 SVBV ORF I 的 PCR 产物

Fig. 1. PCR products of SVBV ORF I

2.2 SVBV ORF I 的克隆和测序

将 SVBV ORF I 片段克隆并测序, 序列全长 1 033 bp, 序列的 GenBank 登录号为: FN689701。该片段 22~1 008 bp 含有一个完整的 ORF, ORF I 序列全长为 987 bp, 编码 328 个氨基酸。

2.3 序列比较及分子进化分析

将 SVBV ORF I (SVBV-China) 序列与 GenBank 已登录的花椰菜花叶病毒属各分离物 ORF I 序列进行核苷酸序列相似性比较, 结果见表 2。

由表 2 可知, 中国 SVBV ORF I (SVBV-China) 与美国 SVBV ORF I (SVBV-USA) 序列相似性最高, 达 88.3%。而与同属其他成员的序列相似性均较低, 为 30.6%~34.3%, 其中与乌饭树红环斑病毒 ORF I (BRRV-New Jersey) 序列相似性最低, 仅为 30.6%。

利用 DNAMAN 软件构建 SVBV ORF I 以及花椰菜花叶病毒属其他成员 ORF I 的系统进化树 (图 2)。可以看出, BRRV (乌饭树红环斑病毒) 单独聚成一组, 而花椰菜花叶病毒属其他成员 SVBV、CaMV、DaMV (大丽花花叶病毒)、FMV (玄参花叶病毒)、CERV (麝香石竹蚀环病毒) 聚成另一组, 其中 2 个来源于草莓的 SVBV 聚成一个独立的亚分支。

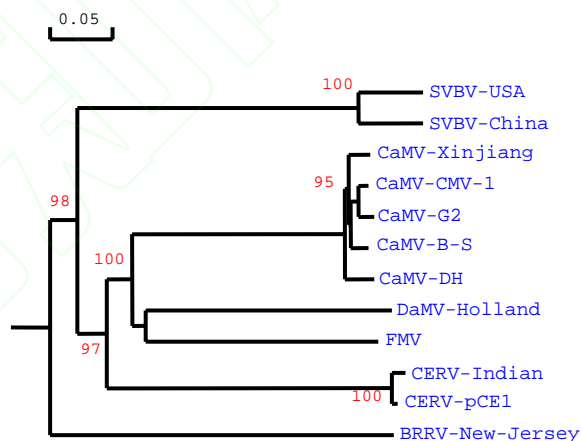


图 2 基于 SVBV ORF I 与花椰菜病毒属其它 11 个成员 ORF I 核苷酸序列构建的系统关系树

Fig. 2. Relationship dendrogram based on the alignment of nucleotide sequences of SVBV ORF I and other 11 members of *Caulimovirus*

3 讨论

本研究首次克隆了中国草莓镶脉病毒 (SVBV) ORF I 基因, ORF I 序列全长 987 bp, 编码 328 个氨基酸。序列分析表明, 中国 SVBV ORF I 与美国 SVBV ORF I 序列相似性达 88.3%, 这表明由于地理来源不同, SVBV ORF I 基因存在着一定程度的分子

表2 SVBV ORF I与花椰菜花叶病毒属其他11个成员ORF I核苷酸序列相似性

Table 2. Nucleotide sequence similarity between SVBV ORF I and ORF I of other 11 members of *Caulimovirus* %

<i>Caulimovirus</i> ORF I	CaMV- DH	CaMV- G2	CaMV- CMV-1	CaMV- B-S	CERV- pCE1	SVBV- USA
SVBV- China	32.1	34.0	32.7	33.8	33.3	88.3

<i>Caulimovirus</i> ORF I	DaMV- Holland	FMV	BRRV- New Jersey	CERV- Indian	CaMV- Xinjiang
SVBV- China	33.6	33.2	30.6	34.3	33.2

变异。SVBV ORF I与花椰菜花叶病毒属其他成员的ORF I序列相似性均较低, 仅为30.6%~34.3%, 从构建的ORF I系统进化树也可以看出, 2个来源于草莓的SVBV ORF I单独形成一个亚分支, 说明来源于草莓的2个SVBV亲缘关系最近, 而与花椰菜花叶病毒属其他成员之间的亲缘关系均较远。

序列比对可知(以下数据未列出), 花椰菜花叶病毒属不同成员ORF I序列相似性极低, 仅为27.1%~51.5%。而同一成员不同分离物ORF I序列相似性较高, 如不同地理来源的5个CaMV分离物ORF I序列相似性达94.9%~97.8%, CERV-Indian和CERV-pCE1 ORF I序列相似性更是高达98.3%。本实验室曾报道了中国SVBV CP基因序列与美国报道的SVBV CP基因序列相似性达83.4%, 而与花椰菜花叶病毒属其他成员的CP基因序列相似性仅为27.1%~33.2%^[12]。这说明同一病毒成员即使存在着地理隔离, 如2个SVBV分离物分别来自中国和美国, 其基因组变异仍然相对较小。花椰菜花叶病毒属不同成员具有相似的基因组结构和相同的复制机制, 但同属不同病毒成员之间基因组变异极大, 这可能与病毒在进化过程中对各自寄主的适应性有关。花椰菜花叶病毒属不同病毒成员各个对应的ORF核苷酸序列差异巨大, 还可能导致同一ORF编码蛋白的功能有所变化。

花椰菜花叶病毒科多个成员ORF I编码蛋白的功能鉴定已见报道, 一般认为ORF I编码的蛋白多与病毒移动有关。CaMV ORF I编码的蛋白可能与35S

RNA结合形成一个复合体, 通过胞间连丝在细胞间转移^[13]。大豆褪绿斑驳病毒(SbCMV) ORF I a突变体不能引起症状, 说明其ORF I a编码的蛋白对于病毒的系统侵染必不可少^[14]。花生褪绿线条病毒(PCISV) ORF I突变体可以在植物体内复制, 但不能在细胞间移动^[15]。CaMV是花椰菜花叶病毒属的代表种, CaMV ORF I编码蛋白的功能研究报道较多。而SVBV ORF I编码蛋白的功能可能由于其基因核苷酸变异而导致功能差异, SVBV ORF I编码蛋白的起始区氨基酸序列与TMV的移动蛋白类似^[10], 但SVBV ORF I编码蛋白是否具有移动蛋白的功能或其他功能至今尚未见报道, 将在下一步的研究中探讨。

参考文献:

- [1] Converse R H. Modern approaches to strawberry virus research [J]. *Acta Hort.* 1992, 308: 19-30.
- [2] Honetšlegrová J, Mráz I, Špak J. Detection and isolation of strawberry vein banding virus in the Czech Republic [J]. *Acta Hort.* 1995, 385: 29-32.
- [3] Petrzik K, Mráz I, Dulić-Marković I. Quarantine strawberry vein banding virus firstly detected in Slovakia and Serbia [J]. *Acta Virol.* 1998, 42 (2): 87-89.
- [4] 肖敏, 张志宏, 代红艳, 等. PCR 检测草莓镶脉病毒的稳定性研究 [J]. *果树学报*, 2005, 22 (5): 483-487.
- [5] 周厚成, 李思源, 何水涛, 等. 草莓镶脉病毒的PCR检测及特异片段的序列分析 [J]. *果树学报*, 2005, 22 (3): 286-288.

- [6] Morris T J, Mullin R H, Schlegel D E, et al. Isolation of a caulimovirus from strawberry tissue infected with strawberry vein banding virus [J]. *Phytopathology*, 1980, 70: 156-160.
- [7] 隋春, 吴禄平, 张志宏. 利用 PCR 技术检测草莓镶脉病毒[J]. *园艺学报*, 2003, 30(1): 82-84.
- [8] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 40-42.
- [9] Stenger D C, Mullin R H, Morris T J. Isolation, molecular cloning, and detection of strawberry vein banding virus DNA [J]. *Phytopathology*, 1988, 78: 154-159.
- [10] Petrzik K, Beneš V, Mráz I, et al. Strawberry vein banding virus—definitive member of the genus caulimovirus [J]. *Virus Genes*, 1998, 16 (3): 303-305.
- [11] Yan M M, Wei G C, Pan X H, et al. A Method Suitable for Extracting Genomic DNA from Animal and Plant—Modified CTAB Method [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9 (2): 39-41.
- [12] 李爽, 李瑞, 宋培培, 等. 草莓镶脉病毒 (SVBV) CP基因的克隆及序列分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2009, 36(2): 315-318
- Genomic DNA from Animal and Plant—Modified CTAB Method [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9 (2): 39-41.
- [12] 李爽, 李瑞, 宋培培, 等. 草莓镶脉病毒 (SVBV) CP基因的克隆及序列分析. *安徽农业大学学报*, 2009, 36(2): 315-318.
- [13] Citovsky V, Knorr D, Zambryski P. Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein. [J]. *PNAS*, 1991, 88: 2476-2480.
- [14] Thomas C L, Perbal C, Maule A J. A mutation in cauliflower mosaic virus gene I interferes with virus movement but not virus replication [J]. *Virology*, 1993, 192: 415-421.
- [15] Ducasse D A, Mushegian A R, Shepherd R J. Gene I mutants of peanut chlorotic streak virus, a caulimovirus, replicate in plants but do not move from cell to cell [J]. *J Virol*, 1995, 69 (9): 5781-5786.