

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01125

马铃薯 Y 病毒 *pipo* 基因的分子变异及结构特征分析

高芳奎¹, 沈建国², 史凤阳¹, 常飞¹, 谢联辉¹, 詹家绥¹

1. 福建农林大学植物病毒研究所, 福建省植物病毒学重点实验室, 福州 350002;
2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福州 350001

摘要: 为揭示马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY) *pipo* 基因的分子变异和结构特征, 文章根据文献报道的马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*) *pipo* 基因保守区序列设计一对简并引物, 从感染 PVY 的马铃薯病叶中克隆获得 *pipo* 基因的 cDNA 全长序列, 分析其核苷酸序列和氨基酸序列的特征, 并基于氨基酸序列使用贝叶斯法重建了 *Potyvirus* 的系统发育树。结果显示: 20 个 PVY 分离物成功扩增出预期大小(约 235 bp)的特异性片段, 其核苷酸序列与已报道的其它 PVY 株系的 *pipo* 基因核苷酸序列一致性均在 92% 以上; 5' 端均含有典型的 G₁₋₂A₆₋₇ 基序(motif), 无碱基插入/缺失, 所有的核苷酸变异都是碱基置换, 共发现 13 个多态性位点, 其中 4 个简约信息位点, 9 个单一变异位点, 表明该基因高度保守, 但不同分离物也存在一定的分子变异; PIPO 蛋白理论等电点 11.26~11.62, 无信号肽和跨膜区, 是可溶的亲水性蛋白; 整个蛋白含有 3 个保守区, 其中位于 10~59aa 的基序最为保守。该蛋白主要定位于线粒体中, 可能是线粒体导肽。系统发育分析结果显示, 源于 PVY 不同株系优先相聚成簇, 而向日葵褪绿斑驳病毒(*Sunflower chlorotic mottle virus*, SuCMoV)与辣椒重花叶病毒(*Pepper severe mosaic virus*, PepSMV)的亲缘关系较 PVY 相比更近, 与前人的结果相一致, 表明 PIPO 蛋白可以作为研究 *Potyvirus* 系统发育关系的新的分子标记。

关键词: 马铃薯 Y 病毒; *pipo* 基因; 病毒进化

Sequence variation and protein structure of *pipo* gene in *Potato virus Y*

GAO Fang-Luan¹, SHEN Jian-Guo², SHI Feng-Yang¹, CHANG Fei¹, XIE Lian-Hui¹, ZHAN Jia-Sui¹

1. Fujian Key Laboratory of Plant Virology, Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Inspection & Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China

Abstract: The objectives of this study were to understand the sequence variation and the putative protein structure of

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-07-08

基金项目: 国家现代农业马铃薯产业技术体系(编号: CARS-10), 福建省自然科学基金项目(编号: 2013J01088), 福建省教育厅科技项目(编号: JA12119)和福建出入境检验检疫局科技项目(编号: FK2011-07)资助

作者简介: 高芳奎, 助理研究员, 研究方向: 植物病毒学。Tel: 0591-83767362; E-mail: rainy@fafu.edu.cn

通讯作者: 谢联辉, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物病毒学。E-mail: fjxlh@126.com

詹家绥, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病原群体遗传和进化。E-mail: jiasui.zhan@fafu.edu.cn

致谢: 在马铃薯 Y 病毒毒源的采集过程中得到国家马铃薯产业体系陕西省试验站常勇站长、湖南农业大学胡新喜博士以及本实验室的祝雯博士、杨丽娜和杨策等同学的大力帮助, 在此表示感谢。

网络出版时间: 2013-7-15 11:03:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130715.1103.004.html>

pipo gene in the *Potato virus Y* (PVY) collected from *Solanum tuberosum*. The *pipo* gene in PVY was cloned using a pair of degenerate primers designed from its conserved region and its sequences were used to re-construct phylogenetic tree in *Potyvirus* genera by a Bayesian inference method. An expected fragment of 235 bp was amplified in all 20 samples by RT-PCR and the *pipo* genes in the 20 samples assayed shared more than 92% nucleotide sequence similarity with the published sequences of PVY strains. Among the 20 *pipo* gene sequences, 13 polymorphic sites were detected, including 4 parsimony informative sites and 9 singleton variable sites. These results indicate that PVY *pipo* gene is highly conserved but some sequence variations exist. Further analyses suggest that the *pipo* gene encodes a hydrophilic protein without signal peptide and transmembrane region. The protein has theoretical isoelectric points (pI) ranging from 11.26 to 11.62 and contains three highly conserved regions, especially between aa 10 and 59. The protein is likely located in the mitochondria and has α -helix secondary structure. Bayesian inference of phylogenetic trees reveals that PVY isolates are clustered in the same branch with high posterior probability, while *Sunflower chlorotic mottle virus* (SoCMoV) and *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) are closely related, consisting with the classification of *Potyvirus* genera using other approaches. Our analyses suggest that the *pipo* gene can be a new marker for phylogenetic analysis of the genera. The results reported in this paper provide useful insights in the genetic variation and the evolution of PVY and can stimulate further research on structure and function of the PIPO protein.

Keywords: *Potato virus Y*; *pipo* gene; evolution of virus

病原物群体遗传结构及其演化机制直接影响植物病害的发生、发展及控制。在寄主、病原和环境的互作体系中,高群体遗传多样性的病原具有相对强的生存和进化优势,能更快适应新的抗病寄主或环境。病原物通过基因突变、遗传迁移和基因重组不断引进和产生新的变异,而这些变异能否在群体中生存和繁衍则由遗传漂变和自然选择所决定。在自然选择下,有害的变异会被逐渐淘汰,而有利的变异则会被不断累积和放大^[1]。然而,不是所有有利突变都能在自然界中生存下来,也不是所有的有害突变都能从群体中消失。有些有益突变会通过遗传漂变和搭便车效应(Hitchhiking effect)从群体中消失,反之,那些对病原物的生存和繁衍有害的变异也会通过这两种途径在群体中保存下来^[1]。因此开展病原物的分子变异及群体结构特征分析有利于了解植物病毒的发生、流行和防控,具有重要的理论和实践意义。

马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)是马铃薯生产上造成经济损失最为严重的植物病毒之一。除了马铃薯, PVY 还可以侵染烟草、番茄等经济作物。PVY 是马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员之一,其基因组由正义单链 RNA 分子组成,大小约 9.7 kb,包含一个大的开放阅读框

(Open reading frame, ORF), 两端含有非编码区(UTR), 表达时先翻译成一个单一的多聚蛋白质(Polyprotein), 再通过自身编码的蛋白酶将多聚蛋白质分割加工为 P1、HC-Pro、P3 等多个成熟蛋白^[2]。*Potyvirus* 病毒编码蛋白的功能极为复杂, 一般都是多功能的, 通过与其他编码蛋白及寄主蛋白的互作共同实现病毒的侵染循环^[3]。多聚蛋白切割是 PVY 基因组通常采用的表达策略, 通过多聚蛋白切割使一个单顺反子 RNA 最终产生一系列成熟且功能各异的蛋白, 也使得病毒基因组中不同基因的遗传变异呈现多样化, 如: 突变、缺失、插入、重组等。除了多聚蛋白切割的表达策略外, 最近研究表明 PVY 基因组也可以通过移码翻译(Reading frame shift)的表达策略产生新蛋白, 所以高变异性是 PVY 基因组的重要特征。

pipo 基因的发现, 改变了长期以来对 PVY 基因组只编码 10 个蛋白的共识^[4]。新近研究发现, *pipo* 基因广泛分布于 *Potyvirus* 中, 位于 P3 顺反子内部, 相对于 P3 以 +2 阅读框相位编码, 其核苷酸序列 5'端含有高度保守的 G GAA AAA A(A)基序(空格为 P3 蛋白的密码子编码相位)。Wen 等^[5]通过研究发现大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)PIPO 蛋白参与了病毒的细胞间运动, 首次确认 *Potyvirus*

pipo 基因的功能, 并首次证实 SMV *pipo* 基因 5' 末端保守的 GA₆ 基序具有影响病毒运动的生物学功能。尽管 Chung 等^[4]通过免疫印迹实验检测到芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)PIPO 蛋白, 证实其存在性, 但研究表明 TuMV PIPO 蛋白不单独表达而以 P3N-PIPO 融合蛋白的方式表达。Wei 等^[6]进一步研究表明 TuMV P3N-PIPO 是一个胞间连丝(Plasmodesmata, PD)定位蛋白, 在植物体内可以和柱状内含体蛋白(Cylindrical inclusion protein, CI)互作。目前, 国内外专家学者对 *Potyvirus* P3N-PIPO 的功能研究作了一些基础研究, 但关于 PVY *pipo* 基因变异的报道仅 Cuevas 等^[7]对 68 个全球 PVY 分离物 PIPO 蛋白的氨基酸长度变异作了初步分析, 结果显示不同分离物的蛋白存在长度变异, 说明 PVY 的适应性进化可能为植物寄主所驱动。

PVY 在世界上广泛流行, 在我国及周边国家呈上升发展趋势。随着近年来农产品贸易的全球化, PVY 变异频繁, 株系分化严重^[8-14], 迫切需要对其遗传变异及分子进化开展研究。PIPO 蛋白是 *Potyvirus* P3 蛋白内移码方式产生的新蛋白, 使得 *pipo* 基因的相关研究成为目前国内外植物病毒学的研究热点, 但对于 PVY *pipo* 基因的分子变异以及 PIPO 蛋白的结构特征的相关研究国内外鲜有报道。为此, 本研究通过扩增、克隆陕西、湖南两省 20 个 PVY 分离物 *pipo* 基因的全长 cDNA 序列, 并应用生物信息学方法对其核苷酸序列、氨基酸序列的分子变异及结构特征等进行了一系列的系统分析, 旨在为探索 PVY *pipo* 基因的遗传变异、分子进化以及进一步开展 PIPO 蛋白的功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒源采集及检测

马铃薯病株是 2011 年采用随机采样法从陕西(4 月)、湖南(8 月)两省的马铃薯主要种植区采集的, 样品经过 Indirect-ELISA 检测和电镜观察以确保毒源为 PVY^[15]。

1.2 RNA 提取及 *pipo* 基因克隆

采用 Trizol 试剂法从感染 PVY 的马铃薯病叶中提取总 RNA, 提取方法参照 RNAsimple Total RNA 试剂盒说明书进行。取 2 μ L 总 RNA 以 oligo(dT)₁₈ 为

引物按照操作说明书进行反转录, 获得 PVY 全长的 cDNA。根据文献^[4]报道的 *pipo* 基因序列保守区, 设计用于扩增 *pipo* 基因的简并引物 PIPO-F(5'-YGA-GYGTGTRCAGATYATGG-3') 和 PIPO-R(5'-TTR-ARTCGCTCRYTCAABCCTG-3'), 预期片段大小为 235 bp, 引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

PCR 扩增采用 50 μ L 反应体系: 10 \times TransTaqTM HiFi Buffer II 5 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μ L, CP-F(10 μ mol/L)2 μ L, CP-R(10 μ mol/L)2 μ L, ddH₂O 34.5 μ L, TransTaqTM HiFi Polymerase(5 U/ μ L)0.5 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 扩增条件为: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 50 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后再 72 延伸 10 min。

PCR 扩增结束后, 取产物 5 μ L 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 产物纯化后克隆至 *pEASY*TM-T5 Zero 载体上, 并转化到 Trans1-T1 感受态细胞中。经菌落 PCR 鉴定获得阳性重组质粒后, 随机选择其中 3~6 个阳性克隆子由南京金斯瑞生物技术有限公司测序, 并通过测序峰图及序列比对分析排除由 PCR 引起的突变。

1.3 *pipo* 基因的核苷酸序列分析

测序获得的序列使用 BioEdit 等软件进行处理, *pipo* 基因的核苷酸一致序列使用 MEGA 软件中的 Muscle (Codons) 子程序进行多重比对, 并根据对应的编码氨基酸序列手动校正。序列同源性主要使用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 计算, 分子变异通过 DnaSP^[16] 等软件进行分析。*pipo* 基因的选择压力分别采用 FEL(Fixed effects likelihood)、IEFL (Internal branches fixed-effects likelihood)、MEME (Mixed effects model of evolution)3 种方法通过在线服务器(<http://www.datamonkey.org/>) 进行检验。判断选择的方向, 主要根据 ω 值(d_N/d_S , 即非同义替换-同义替换速率的比值)进行, 当 $\omega > 1$ 且模型具显著性差异时, 说明为正向选择; 反之, 当 $1 > \omega > 0$ 之间时, 则说明是净化选择。

1.4 PIPO 蛋白的结构特征分析

PIPO 蛋白的理化性质使用 ExPASy 服务器 (<http://www.expasy.org/>) 的 ProtParam 分析, 疏水性、跨膜区、信号肽等功能区分别使用 BioEdit、TMPred 在线程序 (http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form).

html/)和 SignalP 4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行分析,并提交其氨基酸质序列到 TargetP 1.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行亚细胞定位。PIPO 蛋白的保守区使用 MEME 数据库(<http://meme.nbcr.net>)进行分析,二级、三级结构及功能通过 I-TASSER、COFACTOR 在线服务器(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>)进行预测。

1.5 系统发育分析

选取已报道的 *Potyvirus* 48 个种不同病毒及 8 个 PVY 不同株系的 *pipo* 基因氨基酸序列作为参考序列,并从本研究的 20 个 PVY 分离物中选取 8 个特异的氨基酸序列用于构建系统发育树。建树前,使用 MAFFT^[17]软件对建树的 64 条蛋白质序列进行多重序列比对,利用 ProtTest 3.0^[18]选择最优化的蛋白质进化模型——JTT(Jones, Taylor, Thornton)+F 模型,使用 MrBayes3.04 b^[19]软件重建 *Potyvirus* 贝叶斯系统发育树。在重建贝叶斯树过程中,建立 4 个马尔可夫链,以随机树为起始树,共运行 4 000 000 代。每 100 代抽样 1 次,舍弃 25%老化样本后,根据剩余的样本构建一致树,并计算后验概率(Posterior probability)。

2 结果与分析

2.1 *pipo* 基因扩增与序列分析

简并引物对 PIPO-F/PIPO-R 成功地扩增到 *pipo* 基因,扩增产物的片段大小与预计的目的产物一致,约 235 bp(图 1),20 个分离物以及阳性对照均扩增到

目的片段,而阴性对照(健康马铃薯叶片)和空白对照均未扩增到相应的片段。

测序分析后,确定 *pipo* 基因核苷酸序列长度均为 231 bp(GenBank 登录号 :KC577425 ~ KC577444),编码 75 个氨基酸长度的 PIPO 蛋白,序列同源性分析显示 20 个 PVY 分离物 *pipo* 基因与已登录 GenBank 的 PVY 不同株系核苷酸序列一致性均在 92%以上,其中与 PVY^C 株系的序列一致性最低,为 92%~96%,而与其它株系的序列一致性均超过 96%(表 1),表明 PVY *pipo* 基因序列高度保守。

20 个 PVY 分离物的 *pipo* 基因均以 +2 阅读框开始(图 2A),都含有典型的 G₁₋₂A₆₋₇ 基序(图 2B),不存在碱基插入/缺失现象,所有的核苷酸变异都是碱基置换,有 13 个(占总分离位点的 6.04%)多态性位点(Polymorphic sites),其中 4 个为简约信息位点(Parsimony informative sites),9 个为单一变异位点(Singleton variable sites)。PIPO 蛋白的第一个氨基酸为赖氨酸(Lysine, K)(图 2B),整个蛋白存在 8 个变异的氨基酸位点(表 2),其中分离物 CS13、CS14、CS19、ShX20、ShX21 各有一个特异性氨基酸突变位点。在这 20 个 *pipo* 基因的 228 个位点中,除了 FEL 法检测到 2 个净化选择($1 > \omega > 0$)位点外,其他均未检测到正向选择($\omega > 1$)压力位点(表 3),大部分密码子处于中性选择,说明 *pipo* 基因可能主要以中性进化为主。

2.2 PIPO 蛋白质分析

PIPO 蛋白的分子量大约 7.4~8.9 kDa,理论等电点(pI)为 11.26~11.62,溶解度为 98%,属于可溶蛋

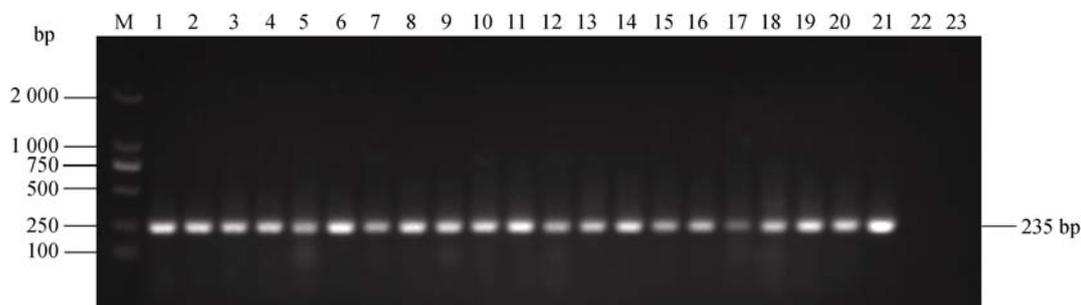


图 1 PVY *pipo* 基因扩增结果

M: DL2000 DNA 分子量标准;泳道 1~23:分离物 CS13、CS14、CS15、CS16、CS17、CS18、CS19、CS20、CS23、CS26、CS36、ShX03、ShX08、ShX12、ShX14、ShX16、ShX18、ShX19、ShX20、ShX21、阳性对照、阴性对照、空白对照。

白, 不稳定指数为 47.19~55.62, 脂肪指数为 92.27~97.47, 有两个疏水性区域(20~24 位、50~54 位氨基酸), 平均疏水性值均不高(分别为 1.0 和 1.35), 表现较强的亲水性; 蛋白内不具有典型的跨膜区, 表明可能不是跨膜蛋白; N'端无信号肽, 推测其为非分泌型蛋白。该蛋白主要定位于线粒体中(预测分值为 0.491~0.755), 可能是线粒体导肽(Mitochondrial targeting peptide, mTP)。

PIPO 蛋白含有 3 个明显的保守区, 根据显著性从高到低顺序分别为 Motif 1、Motif 2、Motif 3(表 4), 其中位于 PIPO 蛋白的 10~59 位氨基酸的 Motif 1 区域最保守, 表明其可能在该蛋白行使功能中起着非常重要的作用; 二级结构主要成分为 α 螺旋(α 1- α 4)(图 3A)。PyMOL 软件渲染后的 PIPO 蛋白三维结构如图 3B 所示。同时, COFACTOR 服务器预测显示 PIPO 蛋白存在两个活性位点, 分别是 23 位的天冬

酰胺(Asn)和 59 位的脯氨酸(Pro), 各自具有固醇硫酸酯酶(Steryl-Sulfatase, STS)和核糖核酸酶 P(Ribonuclease P, RNase P)活性(图 3C)。

2.3 系统发育分析

PVY 不同株系(含本研究中的 PVY 不同分离物)相聚在同一簇(Clade A, 后验概率为 100%), 显示出明显的物种特异性。向日葵褪绿斑驳病毒(*Sunflower chlorotic mottle virus*, SuCMoV)先与辣椒重花叶病毒(*Pepper severe mosaic virus*, PepSMV)聚成另一簇(Clade B)后, 才与 PVY 进一步聚成一个大簇(后验概率为 99%)。通过 BLASTP 比对, 发现 PVY 不同株系的 PIPO 蛋白与 SuCMoV、PepSMV 的氨基酸序列一致性分别为 37%~51%和 32%~44%, 而 SuCMoV 与 PepSMV 的序列一致性则高达 61%。系统发育分析结果说明, 与 PVY 相比, SuCMoV 在进化史上与 PepSMV 的亲缘关系更近。

表 1 PVY 不同分离物 *pipo* 基因核苷酸序列一致性(%)

分离物	O-139	PRI-509	N-fr	12-94	PB209	N1	SYR-II-2-8
CS13	98	93	96	98	98	99	98
CS14	98	92	96	99	99	97	99
CS15	98	93	97	99	99	98	99
CS16	99	93	96	98	98	99	98
CS17	99	93	96	98	98	99	98
CS18	99	93	97	99	99	99	99
CS19	98	96	98	98	98	99	98
CS20	99	93	96	98	98	99	98
CS23	99	93	97	99	99	99	99
CS26	99	93	97	99	99	99	99
CS36	99	93	96	98	98	99	98
ShX03	99	93	96	98	98	99	98
ShX08	99	93	96	98	98	99	98
ShX12	99	93	96	98	98	99	98
ShX14	99	93	96	98	98	99	98
ShX16	99	92	96	98	98	99	98
ShX18	99	93	96	98	98	99	98
ShX19	99	93	96	98	98	99	98
ShX20	98	92	97	99	99	98	99
ShX21	98	93	97	99	99	98	99

注: O-139(PVY^O), PRI-509(PVY^C), N-fr(PVY^N), 12-94(PVY^{NTN}), PB209(PVY^{N:O}), N1(PVY^{N:Wi}), SYR-II-2-8(PVY^{NTN-NW})为已登录 GenBank 的 PVY 不同株系的 *pipo* 核苷酸序列, GenBank 登录号分别为 U09509、EU563512、NC_001616、AJ889866、EF026076、HQ912863、AB461451。

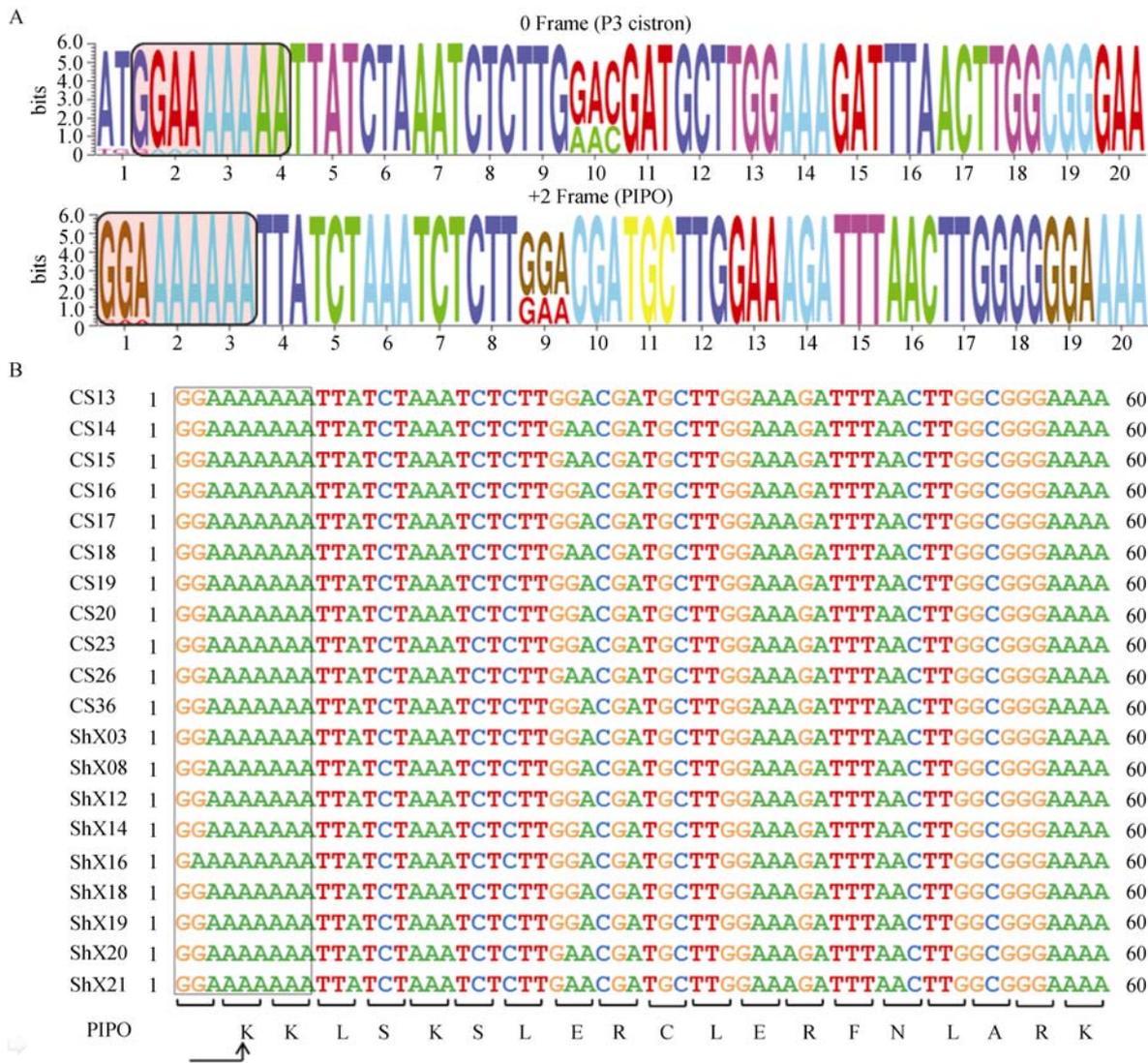


图 2 PVY *pipo* 基因的序列特征

A: 移码翻译; B: PVY *pipo* 基因的多重序列比对(部分)。其中加框显示的为 *pipo* 基因高度保守的 G₁₂A_{6.7} 基序; 箭头为编码 PIPO 蛋白的第一个氨基酸位置。

3 讨论

3.1 *pipo* 基因的分子变异与分子进化

PVY *pipo* 基因具有高度的保守性(表 1), 20 个不同分离物 *pipo* 基因与已知的核苷酸序列一致性均在 92%以上, 说明该基因在病毒的生存和繁殖中起着十分重要的作用。虽然 PVY *pipo* 基因高度保守, 但不同地区分离物也存在一定的分子变异, 20 个分离物共发现有 13 个碱基多态性位点, 其中单一变异位点约占 70%。这些突变体都是通过核苷酸碱基置换形成的, 没有出现序列插入或缺失现象, 说明点

突变在 PVY 进化中起着重要的作用。有些突变体是地区特有的, 比如: 分离物 CS13、CS14、CS19、ShX20、ShX21 均有一个地区特异性的氨基酸位点, 暗示 PVY 群体间存在一定的地理间隔。

pipo 基因整体上以中性进化为主(表 3), 使用 FEL 法在 *pipo* 基因中检测到 2 个净化选择位点(Arg47、Arg73), 而另外两种方法均未检测到显著的选择压力位点。究其原因, 可能有两个方面: 一是 *pipo* 基因可能具有古老的进化历史, 但因其编码的氨基酸序列较短, 可用于检测位点较少, 从而导致适合性进化信号无法被检测。我们对 126 个来自不

同寄主和地区的 PVY 分离物 *pipo* 基因进行进化分析和选择压力检测时, 表明该基因受中性选择为主, 但也存在一个显著的正向选择压力位点, 且该位点在氨基酸的组成上存在寄主、地区特异性(未发表数据); 二是 *pipo* 基因可能处于突变冷点^[20]。

3.2 PIPO 蛋白的结构与功能

组成蛋白质的 20 种氨基酸各自带有不同极性的侧链基因, 疏水性氨基酸位于蛋白质内部, 通过疏水的相互作用, 在保持蛋白质三级结构的形成和稳定中起着重要的作用^[21]。PIPO 蛋白理化蛋白质分析结果可知, 其溶解度为 98%, 且稳定指数高于 40, 表明 PIPO 蛋白为不稳定的可溶蛋白(低于 40 为稳定

表 2 20 个 PVY 分离物 *pipo* 基因氨基酸变异位点的位置

分离物	氨基酸位置							
	8	21	50	58	60	63	67	71
CS13	G	I	Q	G	K	☐	Y	I
CS14	E	.	.	.	R	G	H	☐
CS15	E	.	.	.	R	G	H	.
CS16	G	.	.
CS17	G	.	.
CS18	E	G	.	.
CS19	.	.	☐	.	.	G	.	.
CS20	G	.	.
CS23	G	.	.
CS26	E	G	.	.
CS36	G	.	.
ShX03	G	.	.
ShX08	G	.	.
ShX12	G	.	.
ShX14	G	.	.
ShX16	G	.	.
ShX18	G	.	.
ShX19	G	.	.
ShX20	E	.	.	☐	R	G	H	.
ShX21	E	☐	.	.	.	G	H	.

注: 加框灰度显示的为特异性氨基酸。

表 3 3 种方法检测 PVY *pipo* 基因的选择压力位点

方法	净化选择	中性选择	正向选择
FEL	2(Arg47*, Arg73**)	226	0
IFEL	0	228	0
MEME	0	228	0

注: * $P=0.06$; ** $P=0.09$ 。

蛋白)^[22]。当前蛋白质三维结构的主要预测方法包括同源建模、折叠识别和从头预测 3 种, 其中同源建模是目前应用最成功的一种方法, 由于已知蛋白质结构数据库找不到 PIPO 蛋白的同源蛋白质, 故采用折叠识别法预测 PIPO 蛋白三维结构, I-TASSER 服务器预测结果显示, 折叠子 1fc3A 与 PIPO 蛋白的匹配性非常高, 其各项参数综合值在预测的前 10 个模板蛋白中最高。通过 PIPO 蛋白的保守区(表 4)及空间结构(图 3)分析结果, 显示 PIPO 蛋白含有两个富含 α 螺旋的结构域: Motif 1、Motif 3, 这两个结构域都为 α 螺旋所组成的重复片段结构, 可以参与蛋白-蛋白相互作用。同时, 位于 10~59 位氨基酸的 Motif 1 最为保守, 且两个活性位点 Asn₂₃、Pro₅₉ 也位于其内, 说明该结构域在 PIPO 蛋白功能中发挥着非常重要的作用。蛋白质的结构信息在蛋白质的功能研究上起决定性作用, PIPO 蛋白的结构和功能预测分析可以为 PIPO 蛋白后期的表达纯化、功能研究等相关的实验工作提供重要的参考价值。

3.3 Potyvirus 的系统发育分析

在进化关系上, 由于 SuCMoV 与 PVY 非常接近, 以 CP 基因等为分子标记未能明显区别两者, 故而一直以来被视为 PVY 的分组成员, 归入 PVY 种内。Bejerman 等^[23]通过系统分析表明 SuCMoV 基因组具有明显区别于 PVY 的典型特征, 应作为 *Potyvirus* 的一个新病毒种。从重建的 *Potyvirus* 贝叶斯树(图 4)可以看出, 与 PVY 相比, SoCMoV 和 PepSMV 的亲缘关系更近。CP 基因由于高度保守的特点, 在系统发育研究中, 通常作为病毒分类的分子标记。相比 CP 基因而言, *pipo* 基因也具有高度保守的特点。和 Bejerman 等^[22]的研究结果相同, 以 *pipo* 基因氨基酸序列构建的系统发育树也表明 SuCMoV 是 *Potyvirus* 的一个新病毒种。除外, *Potyvirus* 属内 49 个病毒种以较高的后验概率优先相聚成簇大致形成 10 个大簇, 同一种内病毒总是以较高的后验概率优先相聚成簇, 种内差异小于种间差异。尽管部分分支的后验概率不高, 但基本能够反映出种间的系统发育关系。而基于 *pipo* 基因氨基酸序列构建系统发育树的拓扑结构与目前的分类地位大体一致^[2]。综上所述说明, 以 *pipo* 基因为分子标记用来研究 *Potyvirus* 的系统发育关系是完全可行的。

表 4 PIPO 蛋白的保守区

保守区	位置	E-值	保守序列
Motif 1	10~59aa	1.6e-824	
Motif 2	61~75aa	2.7e-208	
Motif 3	1~8aa	1.9e-072	

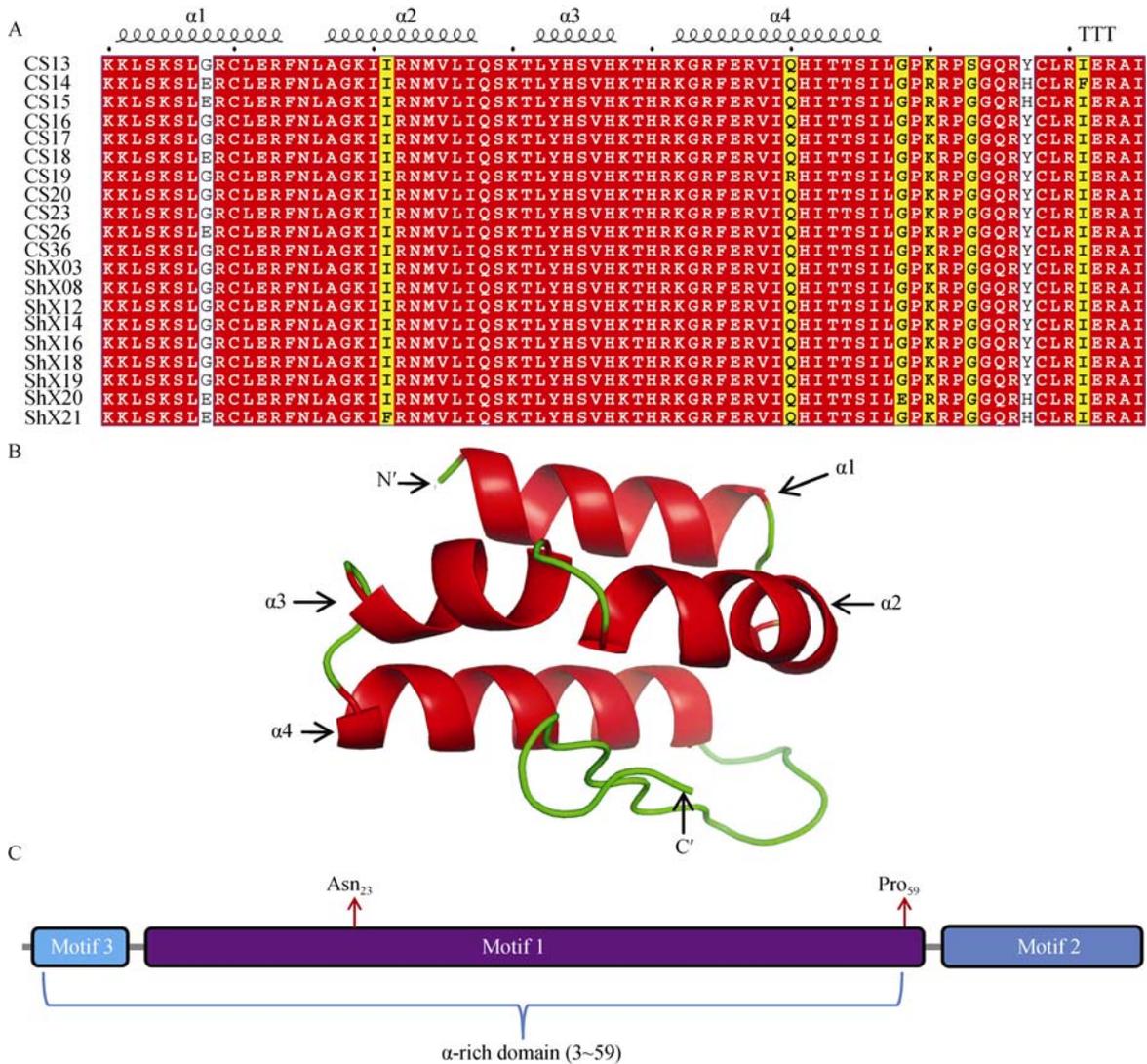


图 3 PVY PIPO 蛋白的结构特征

A : PVY PIPO 蛋白的多重序列比对及二级结构预测($\alpha 1$ - $\alpha 4$ 为 α -螺旋); B : PVY PIPO 蛋白的三维结构预测(红色为 α -螺旋; 绿色为无规则卷曲); C : PVY PIPO 蛋白的结构特征示意图(预测的活性位点: Asn_{23} : 固醇硫酸酯酶; Pro_{59} : 核糖核酸酶 P)。

- [7] Cuevas JM, Delaunay A, Visser JC, Bellstedt DU, Jacquot E, Elena SF. Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37853. [DOI](#)
- [8] Ohshima K, Sako K, Hiraishi C, Nakagawa A, Matsuo K, Ogawa T, Shikata E, Sako N. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with *Potato virus Y* necrotic strain. *Plant Dis*, 2000, 84(10): 1109–1115. [DOI](#)
- [9] 孙琦, 张春庆. PVY^N与 PVY^O病毒 RT-PCR 快速检测体系研究. *中国农业科学*, 2005, 38(1): 213–216. [DOI](#)
- [10] Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, Ohshima K. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Res*, 2008, 131(2): 199–212. [DOI](#)
- [11] 陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 河南 PVY 高致病性株系的发现及其分子特征研究. *河南农业大学学报*, 2010, 44(4): 443–447. [DOI](#)
- [12] 陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 中国部分马铃薯产区马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的株系分化与鉴定. *河南农业大学学报*, 2011, 45(5): 548–551. [DOI](#)
- [13] Hu XX, Nie XZ, He CZ, Xiong XY. Differential pathogenicity of two different recombinant PVY^{NTN} isolates in *Physalis floridana* is likely determined by the coat protein gene. *Virology*, 2011, 8(1): 207. [DOI](#)
- [14] Ogawa T, Nakagawa A, Hataya T, Ohshima K. The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences. *J Phytopathol*, 2012, 160(11–12): 661–673. [DOI](#)
- [15] 高芳奎, 沈建国, 史凤阳, 方治国, 谢联辉, 詹家绥. 中国马铃薯 Y 病毒的检测鉴定及 CP 基因的分子变异. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3125–3133.
- [16] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452. [DOI](#)
- [17] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(4): 772–780. [DOI](#)
- [18] Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2104–2105. [DOI](#)
- [19] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, 2012, 61(3): 539–542. [DOI](#)
- [20] Martincorena I, Seshasayee AS, Luscombe NM. Evidence of non-random mutation rates suggests an evolutionary risk management strategy. *Nature*, 2012, 485(7396): 95–98. [DOI](#)
- [21] 吴祖建, 高芳奎, 沈建国. *生物信息学分析实践*. 北京: 科学出版社, 2010: 107–110. [DOI](#)
- [22] Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*, 1990, 4(2): 155–161. [DOI](#)
- [23] Bejerman N, Giolitti F, de Breuil S, Lenardon S. Molecular characterization of *Sunflower chlorotic mottle virus*: a member of a distinct species in the genus *Potyvirus*. *Arch Virol*, 2010, 155(8): 1331–1335. [DOI](#)