

大豆花叶病毒致病基因的克隆与序列分析

王大刚^{1,2}, 智海剑², 田震², 黄志平¹, 吴倩¹, 张磊¹

(1. 安徽省农业科学院作物研究所/安徽省农作物品质改良重点实验室, 安徽合肥 230031; 2. 南京农业大学大豆研究所/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要:通过生物学纯化与血清学鉴定(ELISA)得到5个大豆花叶病毒(SMV)分离物,利用RT-PCR法扩增其CP、HC-Pro、P1和P3基因片段并进行测序。结果表明:5个分离物P1基因全长均为927个核苷酸,编码产生309个氨基酸。同源性分析表明,5个分离物核苷酸序列同源性为88.0%~99.9%,由此推导的氨基酸序列同源性为86.1%~100.0%。此外,5个分离物4个SMV基因CP、HC-Pro、P1和P3长度均为4137个核苷酸,编码1378个氨基酸。分析结果显示,5个分离物之间的核苷酸及氨基酸的同源性分别为92.6%~99.3%和95.1%~99.2%。根据系统进化树的分析,结合5个分离物在10个大豆鉴别寄主上的致病性反应,发现SMV的4个基因CP、HC-Pro、P1和P3与SMV的致病力及病样的来源地之间具有一定的关系。同时,这4个SMV基因能够将传统的SMV株系分离物与重组性分离物进行区分。

关键词:大豆花叶病毒;致病基因;克隆;序列分析

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0760

Clone and Sequence Analysis of Virulence Genes of Soybean Mosaic Virus Isolates in China

WANG Da-gang^{1,2}, ZHI Hai-jian², TIAN Zhen², HUANG Zhi-ping¹, WU Qian¹, ZHANG Lei¹

(1. Crop Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Quality Improvement of Anhui Province, Hefei 230031, China; 2. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: Five SMV isolates were obtained by using biological purification and serology (DAS-ELISA). The CP, HC-Pro, P1 and P3 gene regions were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequences analysis showed that P1 gene of the each SMV isolates had 927 nucleotides in length, encoding 309 amino acids. Comparison of the sequences of P1 genes between different isolates showed they shared 88.0%~99.9% nucleotide acids identities and 86.1%~100.0% amino acids identities with each other. The four genes from the 5 SMV isolates were composed of 4137 nucleotides, encoding 1378 amino acids, and shared 92.6%~99.3% nucleotide sequence identities and 95.1%~99.2% amino acid sequence identities. The results also revealed that the sequences variation in the CP, HC-Pro, P1 and P3 genes of virus were correlated with the level of virulence and the source of the virus isolates based on the symptom reaction of SMV on differential hosts and the phylogenetic analyses. Meanwhile, the normal soybean mosaic virus isolates and recombinant isolates could be differentiated through the sequences variation of CP, HC-Pro, P1 and P3 genes.

Keywords: Soybean mosaic virus; Virulent genes; Clone; Sequences analysis

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)是马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)的主要成员,是大豆、菜豆、扁豆等豆科作物病毒病的主要病原之一,在世界范围内广泛分布并普遍发生。在我国,SMV是大豆病毒病的主要病害,且从南到北均有发生,长江以南地区比北方地区严重,已经成为我国东北、黄淮和长江流域等大豆主产区最重要的病害之一。

SMV与寄主以及环境长期的共同进化过程中,发生了致病性分化,一般根据SMV在鉴别寄主上的致病性差异确定不同的致病类型,称之为株系。

SMV致病性的差异是其基因组核苷酸序列变异的表现,只有病毒的基因组核苷酸序列才能真实地反映出SMV株系致病性差异的本质^[1-2]。

在SMV致病基因的研究中,CP基因的核苷酸序列是研究最多的一个基因^[3-7]。蛋白结构域研究发现,CP蛋白会影响病毒组装和蚜虫传播病毒的能力,进而影响寄主范围^[8]。王延伟等^[9]研究显示,SMV致病范围相近的分离物,其CP序列同源性较高。CP基因与致病性反应之间有一定的联系^[10],但鉴别寄主反应表明,相同致病性的分离物其CP

收稿日期:2014-12-05

基金项目:国家自然科学基金(31201235, 31371646, 31401402);安徽省自然科学基金(1308085QC59);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室开放课题(ZW2013)。

第一作者简介:王大刚(1979-),男,博士,副研究员,主要从事大豆抗病遗传育种。E-mail: smvwang@163.com。

通讯作者:张磊(1956-),男,研究员,主要从事大豆育种研究。E-mail: leizh66@163.com。

基因序列是有差异的^[10],说明可能还有 SMV 的其它基因参与控制其株系的致病性。

Domier 等^[11]研究认为,SMV 基因编码的 HC-Pro 蛋白也可能与寄主的抗性以及蚜虫的传播有关。结构分析表明 HC-Pro 中心区域影响病毒长距离运输,是 SMV 长距离运输和控制病毒宿主范围的相关因子^[12]。Soe 等^[13]研究发现 HC-Pro 基因编码的一个氨基酸的改变可以使被侵染的大豆产生不同的症状,据此认为 HC-Pro 是 SMV 在大豆上产生不同症状的一个作用因子。然而,刘宁等^[14]通过比较 SMV 分离物源性高低与其在鉴别寄主上的致病性反应时发现,两者的关联并不明显。

SMV 基因 P1 作为一种丝氨酸蛋白酶基因,是病毒的顺式活性组装因子或调控因子^[15]。Domier 等^[11]研究认为,烟草脉斑驳病毒(tobacco vein mottle virus, TVMV)的 P1 蛋白与其病毒粒子在寄主细胞之间的转运有关,还可能与寄主的抗性有关。Rajamäkia 等^[16]研究报道,P1 会增强 HC-Pro 表达水平,辅助 HC-Pro 介导抑制 RNA 沉默,克服病毒抗性机制,在决定宿主范围上起到一定作用。迄今为止,未见对 P1 基因与 SMV 分离物致病性之间关系的比较研究。

P3 蛋白基因位于 SMV 的 5' 末端,其序列高度可变,能以序列特异性方式与 RNA 结合,同时与宿主细胞 RNA 相互作用^[11]。Johansen 等^[17]研究发现 P3 蛋白不仅影响病毒的积累,而且也影响病毒在细胞内的长距离移动,在一定程度上被认为可能与寄主的抗性有关。Jenner 等^[18]报道,P3 的 C 末端与寄主症状表现有关,在一些 Potyvirus 成员中被确认为是无毒决定因子。另外,Suehiro 等^[19]研究表明,P3 蛋白是病毒侵染过程的一个重要因素,在一定程度上决定了病毒侵染的寄主范围。杨清华^[20]通过系统发育分析表明,P3 基因的 C 末端在种内是高度保守的,但是株系致病性的强弱与其 P3 基因的序列差异未发现有明显的相关性。

通过上面的分析可以发现,SMV 基因中的 CP、HC-Pro、P1 和 P3 都有可能与 SMV 的致病性相关^[8,11,13,19],然而通过对某个基因的序列和其在鉴别寄主上的致病性进行分析时却发现其相关性并不显著^[10,14,20]。这可能与选择的鉴别寄主有关,也可能是控制寄主致病性的基因是几个基因共同相互作用的。Germundsson 等^[15]和 Rajamäkia 等^[21]发现 P1 能增强 HC-Pro 的表达水平,从而辅助 HC-Pro 介导抑制 RNA 沉默^[16]。Ruiz-Ferrer 等^[8,22]发现,HC-Pro 作为蚜传毒辅助因子,在病毒粒子与蚜虫口器之间具有“桥梁”作用,HC-Pro 二聚体一侧(C 末

端)与病毒粒子 CP 发生相互作用,另一侧(N 末端)与蚜虫口器上颚刺针相互作用,两者作用强弱决定了病毒在蚜虫刺针上的结合力。

Hajimorad 等^[23-24]和 Eggenberger 等^[25]研究表明,特异性蛋白基因 P3 和 HC-Pro 是抗病基因 *Rsv1* 介导的大豆对 SMV 病害反应的两个相关因子,而 HC-Pro 在 P3 产生致病性中具有重要的辅助因子作用。此外,特异性蛋白基因 P3 也是 *Rsv4* 介导的大豆对 SMV 病害反应的一个关键基因,P3 基因编码的单个氨基酸的改变即可使 SMV 对携带 *Rsv4* 抗病基因的大豆具有无毒或致病的作用^[26]。因此,SMV 致病性可能由一种 SMV 致病基因决定或几种致病基因共同作用的结果。

本研究从病毒的致病基因入手,对 5 个不同来源的大豆花叶病毒分离物的 4 个(CP、HC-Pro、P1 和 P3)致病基因的序列进行了分析,探索 SMV 致病性的差异与 P1 的关系,研究 5 个 SMV 分离物中 4 个致病基因序列的同源性,分析这 4 个致病基因序列的同源性 SMV 在不同大豆品种上致病性反应之间的关系,致力于寻找 SMV 致病基因的序列变化和病毒致病力、地理分布以及株系类型之间的联系,为从分子水平进行大豆花叶病毒株系的划分提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 SMV 分离物 本研究所用 SMV 是在双抗体夹心酶联免疫吸附分析(DAS-ELISA)时表现阳性、生物学方法鉴定时花叶或坏死症状表现明显的 5 个分离物,其中分离物 9355-4 属于流行株系 SC3,采自河南周口;9582-2、9266-1 和 9411-1 属于流行株系 SC7,分别采自安徽宿州、山东济宁和安徽阜阳;9618-1 属于强毒株系 SC13,采自安徽怀远^[2]。各 SMV 分离物在感病寄主南农 1138-2 上繁殖保存,它们在鉴别寄主上的症状反应列于表 1。

1.1.2 试剂和引物 总 RNA 提取试剂盒(RNA simple Total RNA Kit)购自北京天为时代公司。反转录试剂盒(Prime-Script™ RT-PCR Kit)和割胶纯化试剂盒(Prime-Script™ RT-PCR Kit)购自 TaKaRa 公司。pEGM-TE Vector 和 T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司。X-gal、IPTG、Amp 购自南京生兴公司。琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自 Bioflux 公司。其它常用试剂多为国产分析纯。

根据已报道的美国 SMV 株系 G2(登录号 S42280)和株系 G7(登录号 AF241739)的序列,采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物(表 2)。

为保证基因测序的完整性和准确性,设计引物时距离 SMV 各个基因序列上下游各延伸约 100 bp 进行

扩增。引物由上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司合成。

表 1 5 个 SMV 分离物在 10 个大豆鉴别寄主上的反应型

Table 1 Responses of 10 differential soybean genotypes to 5 SMV isolates

分离物 Isolates	南农 1138-2 Nannong 1138-2	诱变 30 Youbian 30	8101	铁丰 25 Tiefeng 25	Davis	Buffalo	早熟 18 Zaoshu 18	Kwanggyo	齐黄 1 号 Qihuang 1	科丰 1 号 Kefeng 1	株系 Strain
9355-4	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	SC3
9582-2	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	SC7
9266-1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	SC7
9411-1	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	SC7
9618-1	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	SC13

S 表示感病(系统花叶或坏死);R 表示抗病(上位叶无症状)。

S denotes susceptible (mosaic or necrosis on inoculated upper leaves); R denotes resistant (symptom-less).

表 2 SMV 致病基因克隆的引物序列

Table 2 Primer sequences used for the clone of SMV virulent genes

基因 Genes	退火温度 /°C	Tm 基因大小 Gene size/bp	正向引物 Forward primers (5'→3')	反向引物 Reverse primers(5'→3')
CP	53	798	ATGCTCAGACAAGTGAGCT	CTCCCTGCCATTCATAAAC
HC-Pro	54	1371	GATATTCAGGAATTCTCCCAAATCTGAAG	CTGTCCTCGAGCTAACCAACTCTGTAGAATTC
P1	50	927	GCGCAAACAGAAATTTTCGTAATT	CATTGATGATTCTCCACATGAGG
P3	51	1041	CAATTTGCTTCTAATGACCTTC	AACCGCATCACTCCTTTC

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及反转录-聚合酶链式反应 总 RNA 提取方法见天为时代公司试剂盒;反转录-聚合酶链式反应 (Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 方法见 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0。

1.2.2 SMV 基因的克隆 采用 Bioflux 公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,利用 Promega 公司 T₄ DNA 连接酶将回收产物连入 pEGM-TE 载体,加入到 CaCl₂法制备的感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞上进行转化,在 LB + Amp + IPTG + X-gal 平板上挑取白色单克隆斑后培养。

1.2.3 序列测定及分析 PCR 产物割胶纯化后,以菌落为模板进行 PCR 反应,1% 琼脂糖凝胶电泳检测含有目的插入片段的阳性克隆由上海博亚生物技术有限公司进行双向测序,每个样品重复测序 1 次。

将测得的大豆花叶病毒 CP、HC-Pro、P1 和 P3 基因在美国国立生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GenBank 数据库中进行 Blast。搜索到已报道的 SMV 其它株系或分离物的 CP、HC-Pro、P1 和 P3 蛋白基因序列,利用 Dnaman_8.0 生物软件分析 CP、HC-Pro、P1 和 P3 蛋白基因的核苷酸和氨基酸的同源性;基于 CP、HC-Pro、P1 和 P3 基因的氨基酸序列,采用 Clustal X

1.83 和 MEGA 4.1 软件,利用 Neighbour-joining 方法构建系统发育树,bootstrap 值为 1 000;隐藏可信度小于 60% 的值。用 GeneDoc 3.2 软件显示多重序列分析结果。

2 结果与分析

2.1 大豆花叶病毒 CP、HC-Pro、P1 和 P3 基因的扩增

以各分离物反转录得到的 cDNA 第一链为模板,分别扩增 CP、HC-Pro、P1 和 P3 基因。5 个分离物均得到相应基因的目标片段,和预期片段大小一致。

2.2 P1 基因的序列分析

5 个供试分离物 P1 基因测序结果经分析后发现,其长度均为 927 个核苷酸,编码 309 个氨基酸 (图 1)。5 个 SMV 分离物的 P1 基因高度同源 (表 3),其核苷酸序列同源性为 88.0% ~ 99.9%,氨基酸序列同源性为 86.1% ~ 100.0%。309 个氨基酸残基共存在 33 处差异,分散在整条 P1 序列上。分离物 9266-1 与 9618-1 仅有 1 个核苷酸差异,同源性高达 99.9%,并无氨基酸的差异,然而二者虽然在 10 个鉴别寄主上的 8 个症状反应相同,但在早熟 18 和 Kwanggyo 上却并不相同;9411-1 与 9582-2 存在 1 个氨基酸差异,同源性为 99.7%,二者在 10 个鉴别

寄主上的症状反应相同;9266-1 与 9355-4 氨基酸的同源性仅为 86.1%,二者在 10 个鉴别寄主上的症状反应有 4 个不相同;然而 9266-1 与 9582-2 氨基酸的同源性也为 86.1%,但二者在 10 个鉴别寄主上

的反应却完全相同。以上结果表明,SMV 分离物 P1 基因的同源性 SMV 在鉴别寄主上的致病性反应存在一定的关系,但不能完全与 SMV 的致病性一一对应。

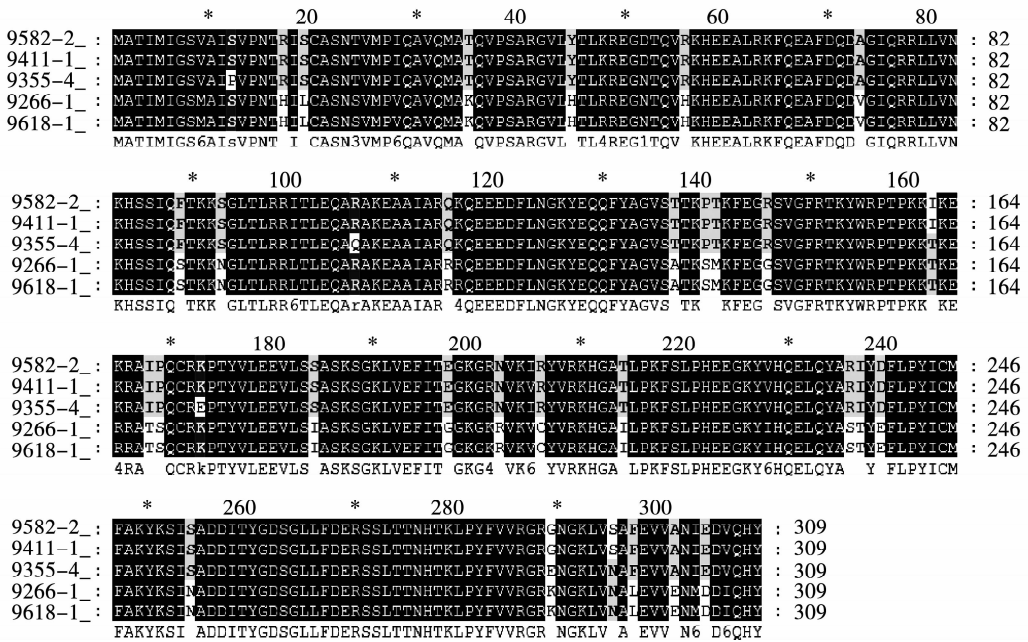


图 1 5 个 SMV 分离物的 P1 基因编码氨基酸序列
Fig. 1 P1 Amino acid sequences of five SMV isolates

表 3 5 个所测分离物 P1 基因的核苷酸及氨基酸的同源性比较

Table 3 Pair wise comparisons of P1 gene of 5 sequenced isolates (%)

	9582-2	9355-4	9266-1	9618-1	9411-1
9582-2	**	98.3	88.0	88.1	99.7
9355-4	97.7	**	88.3	88.5	98.2
9266-1	86.1	86.1	**	99.9	88.2
9618-1	86.1	86.1	100.0	**	88.3
9411-1	99.7	97.4	86.4	86.4	**

** 上为核苷酸同源性; ** 下为氨基酸同源性。

** nucleotide identities upper right; ** amino acid identities lower left

2.3 SMV 的 4 个基因序列差异与其致病性的关系

测得 5 个供试分离物的 4 个 SMV 基因 CP、HC-Pro、P1 和 P3 长度均为 4 137 个核苷酸,编码 1 378 个氨基酸。利用 5 个分离物的这 4 个 SMV 基因氨基酸序列构建系统发育树。依据遗传距离的远近,将系统发育树归为 2 组(图 2)。组 I 中包含 3 个 SMV 分离物:9582-2、9355-4 和 9411-1,组 II 中包含 2 个 SMV 分离物:9266-1 和 9411-1。多重序列分析显示,在 1 378 个氨基酸位点中,73 个位点发生变化。图 3 仅显示氨基酸变化位点。

结合同源性分析、系统发育树和多重序列分析,结果显示,5 个分离物之间的核苷酸及氨基酸的同源性分别为 92.6% ~ 99.3% 和 95.1% ~ 99.2%

(表 4)。在流行株系 SC7 中,3 个分离物在 10 个鉴别寄主上具有相同的致病性,而 4 个基因的氨基酸序列却并不完全相同,其中 9582-2 与 9266-1 的氨基酸同源性为 96.1%,9582-2 与 9411-1 的氨基酸同源性较高,为 98.5%;9266-1 与 9411-1 的氨基酸同源性为 95.6%。另外,致病性差异较大的分离物 9582-2 与 9355-4 序列变化相近,氨基酸同源性达到 99.2%;分离物 9266-1 和 9618-1 具有相同的致病性,两者序列变化相似,氨基酸同源性为 98.8%。由此,推测这 4 个 SMV 致病基因的序列差异在一定程度上影响了 SMV 株系的致病性,但并不完全相关,可能与分离物较少的数量有关。

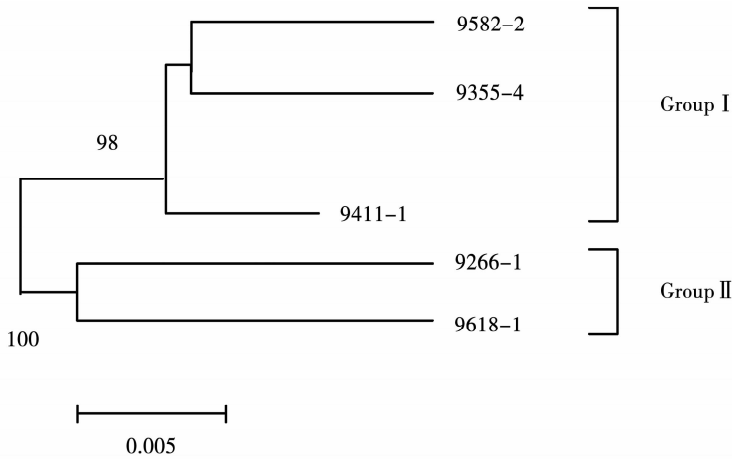
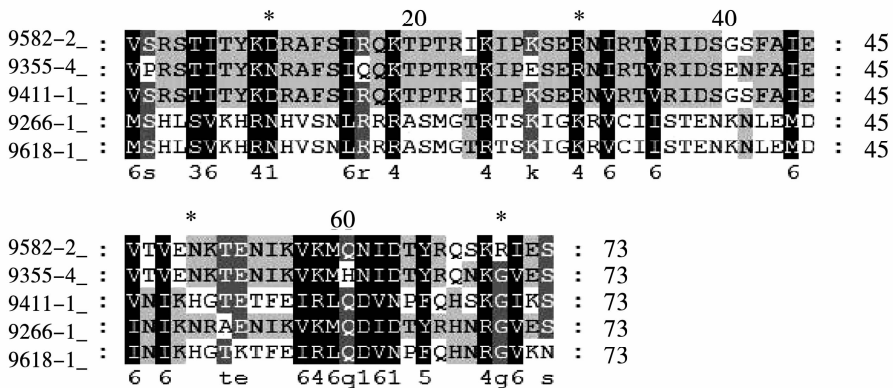


图 2 5 个 SMV 分离物 4 个基因的氨基酸序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of 4 SMV isolates based on 4 genes at the amino acid levels



共 73 个氨基酸位点发生变化。

There were 73 changed amino acid positions in *CP, HC-Pro, P1* and *P3* coding regions.

图 3 5 个 SMV 分离物 4 个基因的氨基酸变化位点

Fig. 3 Amino acid sequence alignment based on changed positions of 4 genes of SMV

表 4 5 个所测分离物 4 个 SMV 基因的核苷酸及氨基酸的同源性比较

Table 4 Pairwise comparisons of *CP, HC-Pro, P1* and *P3* gene of 5 sequenced isolates (%)

	9582-2	9355-4	9266-1	9618-1	9411-1
9582-2	* *	99.3	95.1	92.6	96.2
9355-4	99.2	* *	95.4	92.9	95.7
9266-1	96.1	96.2	* *	96.7	94.0
9618-1	95.1	95.2	98.8	* *	95.6
9411-1	98.5	97.8	95.6	96.6	* *

** 上为核苷酸同源性; ** 下为氨基酸同源性。

** nucleotide identities upper right; ** amino acid identities lower left.

2.4 SMV 种内 4 个基因序列的同源性

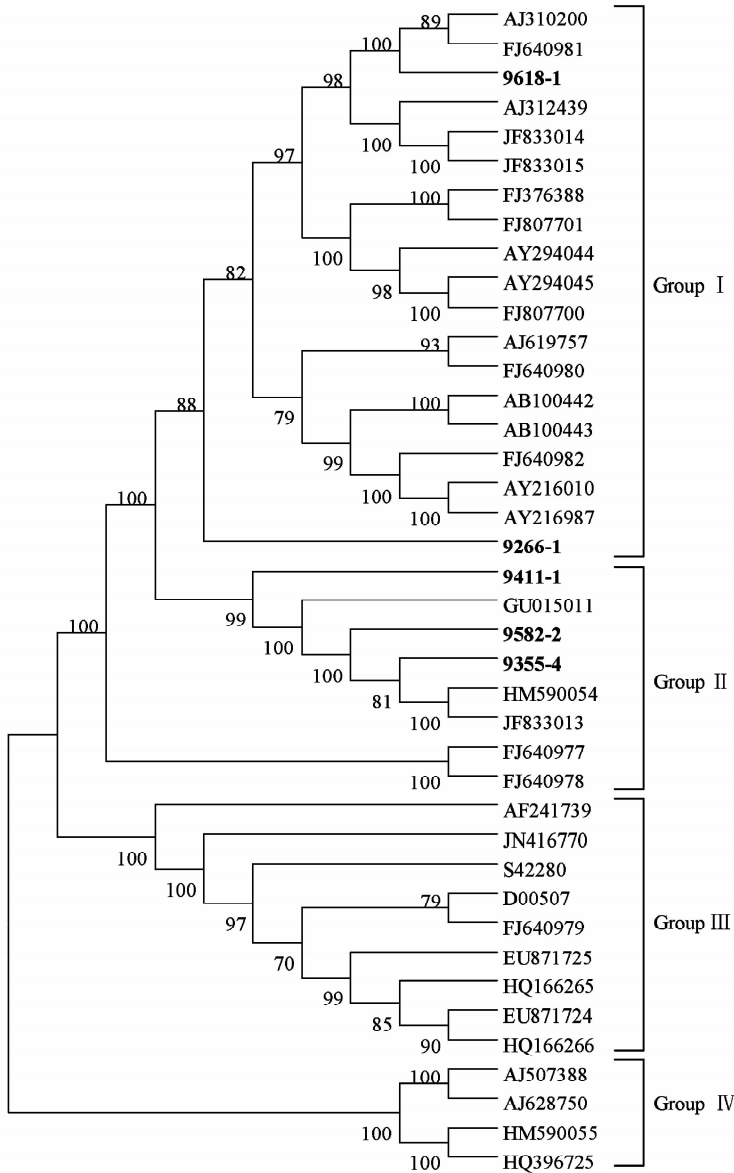
将测得的 5 个分离物的 4 个 SMV 基因序列与国内外 35 个 SMV 分离物的序列进行同源性和系统发育比较分析(图 4), 结果表明 SMV 分离物之间这 4 个基因序列核苷酸和氨基酸同源性分别在 71.8% ~ 100% 和 71.7% ~ 100%。40 个 SMV 分离物根据 4 个 SMV 基因的序列共分为 4 组(Group I ~ IV), 其中属于 SC7 株系的分离物 9266-1 和属于 SC13 株系的分离物 9618-1 被分在了组 I, 该组共有 19 个分

离物, 分别来自于中国、美国和韩国, 均是属于中强毒株系的分离物。组 II 的 8 个分离物有 6 个来自于中国, 2 个来自美国, 均属于弱中毒株系。

组 III 有 9 个分离物, 均来自于美国和加拿大, 包含的株系比较复杂, 既有强毒株系 G7 等, 又有弱中毒株系 G2 和 G4 等, 甚至还有无毒株系 SMVN, 显示出 SMV 病毒的复杂性。组 IV 仅有 4 个 SMV 分离物, 同源性分析表明这 4 个分离物与大部分其它分离物的同源性均不高, 其中分离物 HM590055 是

BCMV 与 SMV 的一个重组序列, HQ396725 是 WMV 与 SMV 的重组序列^[27]。杨清华^[20]根据 P3 序列的分析结果推测, 病毒分离物 AJ628750 和 AJ507388

的 P3 编码区可能发生了 SMV 和 WMV 的种间重组。



遗传距离比例为 0.1; 加粗本研究测得的序列。

The horizontal branch lengths are proportional to the genetic distance of 0.1. The sequences reported in this paper are highlighted in boldface.

图 4 大豆花叶病毒之间 4 个基因 (*CP*、*HC-Pro*、*P1* 和 *P3*) 氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic relationship with SMV isolates based on the *CP*, *HC-Pro*, *P1* and *P3* coding region at the amino acid level

3 讨论

目前, SMV 的株系划分是根据其在鉴别寄主上的致病性反应来确定的, 而其致病性实际上是寄主与病毒间相互作用的结果。此外, 鉴别寄主的数量多少决定着株系划分的多少, 具有一定的随机性。因此, 病毒株系的精确划分应建立在病毒的分子水平上, 即根据病毒的核苷酸及氨基酸的序列差

异划分株系^[10,14]。SMV 全长约 10 000 个核苷酸, 通过蛋白酶切割加工, 可形成 11 个不同功能的成熟蛋白基因^[28]。多位学者研究表明, SMV 基因 *CP*、*HC-Pro*、*P1* 和 *P3* 都有可能与病毒侵染的寄主范围相关^[8,11,13,19], 然而, 无论是 *HC-Pro* 基因, 还是 *CP* 和 *P3* 基因其致病性与鉴别寄主划分的株系均没有明显的关系^[10,14,20]。本文通过对 SMV 的 *P1* 基因核苷酸及氨基酸序列的同源性进行比较发现, 其与 SMV 在鉴别寄主上的致病性反应存在的关系也并不

明显。

王延伟等^[9]分析发现 SMV 的致病性可能不止由 CP 基因决定,部分蛋白基因或更多的蛋白基因可能共同决定了 SMV 的致病性。刘宁等^[14]认为要从分子序列上探讨病毒基因与致病性反应的关系,建立病毒分子水平的株系划分体系,需进一步了解 SMV 其它基因乃至基因组全序列与致病性的关系。然而根据全基因组序列去建立病毒分子水平的株系划分体系显然是不可取的。而且,章红运^[29]报道未发现 SMV 致病力与其全基因组序列之间有明显的联系。

基于此,本文综合研究了 4 个与 SMV 寄主范围相关的致病基因 CP、HC-Pro、P1 和 P3^[8,11,13,19],根据 40 个 SMV 分离物系统进化树的分析结果发现这 4 个基因与 SMV 的致病性存在一定的相关性。其中划分在组 I 中的 19 个分离物,其在鉴别寄主上的致病性反应为中强毒株系,而组 II 中 8 个分离物全部都是弱中毒株系。由此说明根据这 4 个基因的氨基酸序列可以一定程度上区分 SMV 的弱毒株系和强毒株系,而中毒株系在 2 个组中均有分布,可能由于株系组成的复杂性以及不同的生态环境导致不同地区品种抗性和分离物毒力水平之间的差别。此外,Zhang 等^[30]分析发现 SMV 的 CI 基因与病毒致病力之间具有明显的联系,这也可能是利用 4 个 SMV 致病基因并不能完全区分病毒致病力的一个因素。

本研究发现,4 个 SMV 基因 CP、HC-Pro、P1 和 P3 与 SMV 样品的来源地之间有着很好的对应关系。其中组 I 和组 III 以国外株系为主,组 II 以中国株系为主,组 IV 全部为中国株系。如果进一步分析可以发现,组 II 可以分为 2 个亚群,一个全部是中国株系的分离物,一个全部是美国株系的分离物。章红运^[29]发现 SMV 的 CI 基因与病毒来源地之间具有明显的联系,但 SMV 全基因组无论在氨基酸还是核苷酸水平都未发现明显的地域关联性。同时其对其的单个基因的核苷酸序列和氨基酸进行了系统进化分析,均未发现单个基因核苷酸与氨基酸序列和 SMV 样品来源地间有明显的联系^[29]。因此,推测 11 个 SMV 基因中综合考虑 CP、HC-Pro、P1、P3 和 CI 这 5 个 SMV 基因的核苷酸序列和氨基酸序列,可为区分 SMV 致病力及样品的来源地提供参考。

研究还发现,通过对这 4 个基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行比较,可以将传统的株系分离物与重组性分离物进行区分,其中组 I ~ III 全部为传统性的 SMV 株系分离物,而组 IV 则均为重组性的分

离物。章红运^[29]通过 Tajima 测验分析结果表明,SMV 的各基因受到不同程度的负向选择压力,其中 P1 和 HC-Pro 的基因可能受到更大的选择压力。再进一步分析发现,Fu 和 Li's 的 D* 值均比 Tajima's 的 D 值低,说明 SMV 在近期的突变率增加^[29]。Yang 等^[27]对 206 个来源于中国不同省市的分离物和病样进行 SMV 类型的检测,结果表明,有 36 个分离物和病样是 SMV 重组类型的病毒,并且重组事件是在 P1 编码区域内发生的。因此,为了快速检测 SMV 的变异株系,可以将 CP、HC-Pro、P1 和 P3 这 4 个 SMV 基因作为突变株系分类的参考依据。

参考文献

- [1] 陈炯,黎昊雁,尚佑芬,等.大豆花叶病毒黄淮 5 号株系的基因组全序列分析[J].病毒学报,2002,9(3):270-274. (Chen J, Li H Y, Shang Y F, et al. Biological characterization and sequence analysis of soybean mosaic virus of Chinese Huang-Huai 5 strain [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 9(3): 270-274.)
- [2] 王大刚,田震,李凯,等.鲁豫皖大豆产区大豆花叶病毒株系的鉴定及动态变化分析[J].大豆科学,2013,32(6):806-809. (Wang D G, Tian Z, Li K, et al. Identification and variation analysis of soybean mosaic virus strains in Shandong, Henan and Anhui provinces of China [J]. Soybean Science, 2013, 32(6): 806-809.)
- [3] Eggenberger A L, Stark D M, Beachy R N. The nucleotide sequence of soybean mosaic virus coat protein coding region and its expression in *E. Coli*, *Agro-bacterium tumefaciens* and tobacco callus [J]. Journal of General Virology, 1989, 70: 1853-1860.
- [4] Jayaram C H, Hill J H, Allen M W. Nucleotide sequence of the coat protein genes of two aphid transmissible strains of soybean mosaic virus [J]. Journal of General Virology, 1991, 72: 1001-1003.
- [5] 储瑞银,冷晓红,鲍一明,等.应用聚合酶链式反应扩大大豆花叶病毒外壳蛋白基因及其序列分析[J].植物学报,1992,34(7):523-528. (Chu R Y, Leng X H, Bao Y M, et al. Amplification of soybean mosaic virus coat protein gene by polymerase chain reaction and its sequence analysis [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1992, 34(7): 523-528.)
- [6] 刘俊君,彭学贤.大豆花叶病毒外壳蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J].生物工程学报,1993,9(3):198-203. (Liu J J, Peng X X, Li L, et al. Cloning and expression of coat protein gene of soybean mosaic virus in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1993, 9(3): 198-203.)
- [7] 董宏平,程宁辉,濮祖芹.大豆花叶病毒 Sc 株系外壳蛋白基因的部分序列分析[J].南京师大学报,1998,21(3):67-71. (Dong H P, Cheng N H, Pu Z P. Cloning and partial sequencing of coat protein gene of soybean mosaic virus (the Sc strain of SMV) [J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 1998, 21(3): 67-71.)
- [8] Ruiz-Ferrer V, Goytia E, Martínez-García B, et al. Expression of functionally active helper component protein of tobacco etch potyvirus in the yeast *Pichia pastoris* [J]. Journal of General Virology,

- 2004, 85(1): 241-249.
- [9] 王延伟,智海剑,郭东全,等. 致病性不同的大豆花叶病毒分离物外壳蛋白的基因序列分析[J]. 中国油料作物学报,2006,28(4):461-464. (Wang Y W, Zhi H J, Guo D Q, et al. The sequence analysis of coat protein (CP) gene of soybean mosaic virus (SMV) isolates with different virulence [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006, 28(4): 461-464.)
- [10] 郭东全,智海剑,王延伟,等. 大豆花叶病毒 5 个分离物的鉴定及外壳蛋白序列分析[J]. 大豆科学,2006,25(3):218-222. (Guo D Q, Zhi H J, Wang Y W, et al. Identification and sequence analysis of coat protein gene of five soybean mosaic virus isolates [J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 218-222.)
- [11] Domier L L, Shaw J G, Rhoads R E. *Potyviral* proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimo viral proteins [J]. Virology, 1987, 158(1): 20-27.
- [12] Sáenz P, Salvador B, Simón-Mateo C, et al. Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyvirus-es [J]. Journal of Virology, 2002, 76(4): 1922-1931.
- [13] Seo J K, Sohn S H, Kim K H. A single amino acid change in HC-Pro of soybean mosaic virus alters symptom expression in a soybean cultivar carrying *Rsv1* and *Rsv3* [J]. Archives of Virology, 2011, 156(1): 135-141.
- [14] 刘宁,刘若森,马莹,等. 中国大豆花叶病毒 *HC-Pro* 基因的克隆与序列分析[J]. 大豆科学,2010,29(4):549-554. (Liu N, Liu R M, Ma Y, et al. Cloning and sequence analysis of *HC-Pro* gene of soybean mosaic virus [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 549-554.)
- [15] Germundsson A, Valkonen Jari P T. PI- and VPg-transgenic plants show similar resistance to *potato virus A* and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance [J]. Virus Research, 2006, 116: 208-213.
- [16] Rajamäkia M L, Kelloniemi J, Alminaita A, et al. A novel insertion site inside the *Potyvirus* P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions [J]. Virology, 2005, 342(1): 88-101.
- [17] Johansen I E, Lund O S, Hjulsager C K, et al. Recessive resistance in *Pisum sativum* and *Potyvirus* pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus [J]. Journal of Virology, 2001, 75: 6609-6614.
- [18] Jenner C E, Wang X, Tomimura K, et al. The dual role of the *potyvirus* P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in *Brassica* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(9): 777-784.
- [19] Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, et al. An important determinant of the ability of turnip mosaic virus to infect *Brassica spp.* and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein [J]. Journal of General Virology, 2004, 85(7): 2087-2098.
- [20] 杨清华. 我国大豆花叶病毒的株系分化、P3 基因序列特征以及大豆对强毒株系抗病基因的标记定位 [D]. 南京:南京农业大学,2009. (Yang Q H. Strain differentiation and P3 sequence characteristics of soybean mosaic virus in China and gene mapping of resistance to a virulent strain in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.)
- [21] Rajamäkia M L, Valkonen J P T. Genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem loading of a *Potyvirus* in inoculated potato leaves [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(2): 138-149.
- [22] Ruiz-Ferrer V, Boskovic J, Alfonso C, et al. Structural analysis of tobacco etch *potyvirus* HC-Pro oligomers involved in aphid transmission [J]. Journal of Virology, 2005, 79(6): 3758-3765.
- [23] Hajimorad M R, Eggenberger A L, Hill J H. Loss and gain of elicitor function of soybean mosaic virus G7 provoking *Rsv1*-mediated lethal systemic hypersensitive response maps to P3 [J]. Journal of Virology, 2005, 79(2): 1215-1222.
- [24] Hajimorad M R, Eggenberger A L, Hill J H. Adaptation of soybean mosaic virus avirulent chimeras containing P3 sequences from virulent strains to *Rsv1*-genotype soybeans is mediated by mutations in *HC-Pro* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(7): 937-946.
- [25] Eggenberger A L, Hajimorad M R, Hill J H. Gain of virulence on *Rsv1*-genotype soybean by an avirulent soybean mosaic virus requires concurrent mutations in both P3 and *HC-Pro* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(7): 931-936.
- [26] Chowda-Reddy R V, Sun H Y, Chen H Y, et al. Mutations in the P3 protein of soybean mosaic virus G2 isolates determine virulence on *Rsv4*-genotype soybean [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(1): 37-43.
- [27] Yang Y Q, Li K, Zhi H J, et al. Recombinant soybean mosaic virus is prevalent in Chinese soybean fields [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 159: 1793-1796.
- [28] 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(25): 5897-5902.
- [29] 章红运. 大豆花叶病毒基因组全序列测定及大豆 *eIF4E* 和 *eIFiso4E* 基因与病毒 *VPg* 基因的互作分析 [D]. 南京:南京农业大学,2012. (Zhang H Y. Determination of complete genomic sequence of soybean mosaic virus and interaction analysis between soybean *eIF4E/eIFiso4E* gene and SMV *VPg* gene [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.)
- [30] Zhang H Y, Cui X Y, Chen X, et al. Determination of the complete genomic sequence and molecular biological analysis of soybean mosaic virus [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2012, 34(2): 288-297.