

烟草花叶病毒山西番茄分离物的全基因组序列测定及分析

庞小静¹ 赵慧琪¹ 王德富¹ 刘勇² 牛颜冰^{1*}

(¹山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; ²湖南省农业科学院植物保护研究所, 湖南长沙 410125)

摘要: 为明确山西省晋中市侵染番茄的病毒种类, 采用双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 技术和非序列依赖 PCR 扩增 (sequence-independent amplification, SIA) 方法对感病番茄进行分子鉴定。序列测定及分析发现, 具有花叶、卷曲症状的番茄为烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 所侵染。进一步克隆 TMV 番茄分离物 (TMV-SXFQ) 的全基因组序列, 得到 TMV-SXFQ (GenBank 登录号为 JX993906) 全长为 6 394 bp, 含 4 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)。序列比对分析表明, TMV-SXFQ 与烟草花叶病毒属其他分离物的同源性为 86.3%~99.6%; 系统进化分析表明, TMV-SXFQ 与韩国分离物 IM 聚为一簇、亲缘关系最近。

关键词: 番茄; 病原鉴定; 烟草花叶病毒; 序列分析

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 为茄科番茄属一年生草本植物, 具有生津止渴、健胃消食、清热解毒、补肾利尿等功效。作为广泛种植的蔬菜作物之一, 番茄对我国的农业经济具有重要影响。据统计, 近年来我国每年番茄产量可达 5 000 万 t 以上, 2015 年更是达到了 5 594 万 t, 占全国蔬菜总产量的 7.1%; 2016 年继续增加, 全国番茄种植面积约 110 万 hm² (1 648 万亩), 总产量约 5 686 万 t (马兆红, 2017)。但从 20 世纪 60 年代起番茄病毒病在我国广为传播, 严重影响了番茄的产量和品质。病毒病作为威胁番茄生产的主要病害之一 (周雪平和钱秀红, 1996), 造成某些地区春播番茄减产 30% 左右, 而对夏、秋播番茄影响更大, 严重者甚至绝产, 经济损失巨大 (冯兰香等, 1987; 周建国等, 2013)。目前, 侵染番茄的病毒主要有烟草

花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、烟草卷叶病毒 (*Tobacco leaf curl virus*, TLCV)、苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、番茄褪绿病毒 (*Tomato chlorosis virus*, ToCV)、番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 等 (张桂芝, 2011; Zhao et al., 2013; 赵黎明等, 2014)。

晋中地区作为山西省番茄主产区之一, 笔者于 2012~2013 年在对番茄种植基地进行调研时发现, 番茄病毒病在山西省晋中地区暴发严重, 造成了番茄产量和品质的严重下降, 对番茄产业发展以及当地农民的经济收入影响颇大。为了明确山西省晋中市感病番茄的主要病毒种类, 选择表现花叶、卷曲症状较严重的太谷县番茄种植田块进行深入调查和分析, 利用双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 技术 (Tzanetakis & Martin, 2008) 和非序列依赖 PCR 扩增 (sequence-independent amplification, SIA) 方法 (牛颜冰等, 2014) 对采集的番茄疑似病样进行鉴定, 经序列测定发现晋中地区的番茄被烟草花叶病毒 (TMV) 所侵染, 并将其命名为 TMV-SXFQ; 进一步对 TMV-SXFQ 进行全基因组克隆及分析, 明确其分类地位, 以期防

庞小静, 女, 硕士研究生, 专业方向: 分子植物病毒学, E-mail: 18235412750@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 牛颜冰, 女, 教授, 硕士生导师, 专业方向: 分子植物病毒学和中药 GAP, E-mail: niuyanbingbest@163.com

收稿日期: 2017-02-10; 接受日期: 2017-04-22

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303028), 国家自然科学基金项目 (31540050)

御和控制番茄病毒病提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

番茄疑似病样于2012年7月采自山西省太谷县番茄种植田块,病株叶片表现出褪绿黄化、卷曲等症&状(图1),采集后-80℃保存备用。



图1 山西省太谷县番茄植株田间感病症状
彩色图版见《中国蔬菜》网站: www.cnveg.org, 下同。

1.2 主要试剂

莫洛尼鼠白血病毒逆转录酶(M-MLV)和RNasin核酸酶抑制剂购自Promega公司;克隆载体pMD18-T购自TaKaRa公司;Taqplus DNA polymerase、Taq DNA polymerase和DNA回收试剂盒购自Sangon Biotech公司,CF-11购自Whatman公司。

1.3 试验方法

1.3.1 生物学接种试验 取少许疑似番茄病样叶片,用磷酸缓冲液充分研磨,将其汁液用石英砂摩擦接种于指示植物烟草上,观察症状。

1.3.2 植物病原双链RNA(dsRNA)的提取 选取症状明显的花叶和卷曲叶片,参照牛颜冰等(2011a, 2011b)、Tzanetak&is和Martin(2008)的方法,采用CF-11纤维素分离病毒dsRNA。首先将10g病样用液氮充分研磨,加入10~15mL提取液,充分混匀,4℃、4800r·min⁻¹离心5min,取上清液,加入等体积酚/氯仿去除蛋白;然后用CF-11去分离dsRNA,加入1/10体积3mol·L⁻¹NaAC和3倍体积的无水乙醇沉淀dsRNA;最后用75%乙醇洗涤、干燥,溶于ddH₂O,-20℃保存备用。

1.3.3 非序列依赖性PCR(SIA)和病毒全基因组扩增 以提取的病样dsRNA为模板,利用随机引物XTN269反转录获得病毒cDNA模板,然后再利用引物XTN177进行SIA检测,初步确定感染番茄的病毒种类,具体反应体系和程序参照牛颜冰等

(2015)的方法进行。

为进一步确定侵染番茄的病原种类,根据SIA结果以及NCBI的GenBank中已收录的其他TMV分离物保守区设计了6对特异引物(表1)进行病毒全基因组扩增,其中引物TMV-F1/TMV-R1、TMV-F2/TMV-R2、TMV-F3/TMV-R3扩增病毒5'端非编码区及ORF1,引物TMV-F4/TMV-R4、TMV-F5/TMV-R5扩增病毒ORF2和ORF3,引物TMV-F6/TMV-R6扩增病毒ORF4及3'端非编码区;以健康番茄作为阴性对照。

1.3.4 PCR产物克隆及序列分析 利用琼脂糖凝胶电泳分离目的条带,采用DNA纯化试剂盒回收后将其与PMD18-T Vector进行连接,然后用大肠杆菌DH5α转化,通过菌落PCR鉴定,随机选取3个阳性克隆送至北京华大基因研究中心进行测序。利用GenBank对所得序列进行BLAST检索,再用DNASTAR中的SeqMan软件对测序结果进行拼接。利用DNAMAN软件对所得序列与已报道的TMV分离物进行核苷酸序列、氨基酸序列的同源性和相似性比较,并运用MEGA 5.2软件构建系统进化树。

表1 PCR扩增所用引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	位置/bp
XTN269	AAGCAGTGGTATCAACGCGAGNNNNNN	随机
XTN177	AAGCAGTGGTATCAACGCGAG	随机
M13-47	CGCCAGGTTTCCAGTCACGAC	—
RV-M	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	—
TMV-F1	GTATTTTACAACAATTACC	1~20
TMV-R1	ACTGCTCACTATCTACAC	1045~1062
TMV-F2	AGAGAGGTTTACATGAAGG	939~957
TMV-R2	AGATTCGACACCGCAGC	2223~2239
TMV-F3	CAAATGAAAACTTTAT	2181~2197
TMV-R3	CTGTAATTGCTATTG	3414~3428
TMV-F4	ATGGATCCTTTAGTTAGTA	3329~3347
TMV-R4	CTTCTGAACTCCTCCAA	4722~4738
TMV-F5	TGCTAAACACATCAAGG	4693~4770
TMV-R5	GTAGCATCTAACGTTTC	6030~6046
TMV-F6	GTTGATGAGTTCATGGA	5472~5488
TMV-R6	TGGGCCCTACCGGGGG	6379~6395

2 结果与分析

2.1 生物学接种试验结果

接种14d后,在指示植物烟草上观察到花叶症状(图2),初步证明该番茄病害可能是由病毒引起的。



图2 生物学接种试验结果

2.2 dsRNA 提取和 SIA 检测

将提取的病样 dsRNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 得到大小约 6 000 bp 的条带; 健康对照无条带出现。然后再选用随机引物 XTN269/XTN177, 以提取的 dsRNA 为模板进行 SIA 检测, 得到大小为 963 bp 的条带; 健康对照仍未扩增出任何条带 (图 3)。经克隆、测序和序列比对发现该片段与 TMV 相似性最高, 初步揭示山西省晋中市番茄可能被 TMV 所侵染, 并将该分离物命名为 TMV-SXFQ。

2.3 TMV-SXFQ 全基因组克隆及分析

2.3.1 TMV-SXFQ 全基因组序列的克隆 为了进一步确定山西省晋中市番茄所感染的病毒病原是否为 TMV, 以提取的病样 dsRNA 为模板, 采用 6 对特异引物进行全基因组克隆。结果得到的片段大小与预期相符, 分别为 1 062、1 300、1 247、1 409、1 353 bp 和 923 bp (图 4), 而健康对照未扩增出相应大小的片段。

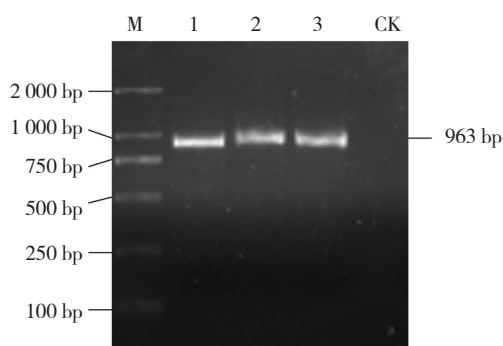


图3 SIA 扩增产物电泳检测结果

M, DL2000™ DNA marker; 1~3, 感病植株; CK, 健康植株; 下图同。

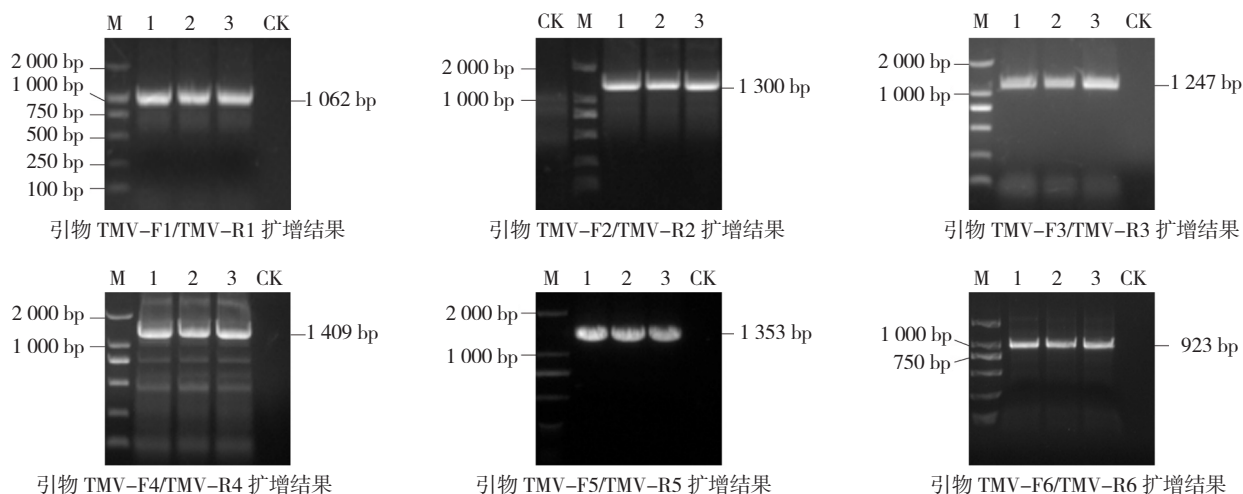


图4 TMV-SXFQ 的 PCR 检测结果

2.3.2 TMV-SXFQ 全基因组序列分析 经序列测定和拼接获得了 TMV-SXFQ 全基因组序列 (GenBank 登录号为 JX993906), 序列分析显示 TMV-SXFQ 全长为 6 394 bp, 含有 4 个开放阅读框 (ORF), 其中 ORF1 起始于 69 位核苷酸, 终止于 3 419 位, 编码 1 116 个氨基酸, 产生分子量为 129 kD 的蛋白; ORF2 是由 ORF1 超读产生, ORF1 终止子为 TAG, 其后为 CAATTA 序列, 这是烟草花叶病毒属病毒

ORF1 通读的典型特征, 该结构增强了终止密码子的通读结构而产生较大的阅读框 ORF2, ORF2 终止于 4 919 位, 含有 4 851 个核苷酸, 编码 1 615 个氨基酸, 产生分子量为 181 kD 的通读蛋白, 129 kD 及 181 kD 两个蛋白均与病毒的复制相关; ORF3 由 807 个核苷酸组成, 编码 268 个氨基酸, 得到分子量为 29 kD 的移动蛋白 (movement protein, MP); ORF4 含有 480 个核苷酸, 编码 159 个氨基酸, 得

到分子量为 17 kD 的外壳蛋白 (coat protein, CP)。TMV-SXFQ 基因组 5' 端 UTR 和 3' 端 UTR 长度分别为 68、203 bp (图 5)。综合分析结果显示, TMV-SXFQ 与烟草花叶病毒属其他分离物的基因组结构基本一致。

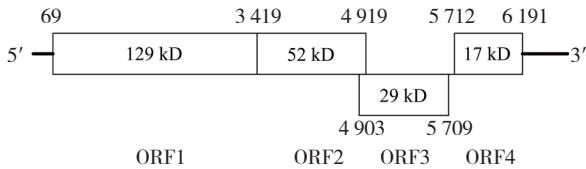


图 5 TMV-SXFQ 基因组结构示意图

2.4 TMV-SXFQ 序列相似性分析

将 TMV-SXFQ 全序列与来自中国、日本、韩国、澳大利亚、美国、西班牙等地区的 17 个烟草花叶病毒属分离物进行核苷酸序列、氨基酸序列同源性和相似性比较分析。结果表明 (表 2), TMV-SXFQ 分离物与其他 TMV 分离物的核苷酸序列同源性为 86.3%~99.6%; 其中与来自韩国的侵染本氏

烟的分离物 IM 同源性最高, 达 99.6%; 而与来自中国台湾的侵染矮牵牛的分离物 pet-TW 以及来自美国的分离物 Ohio V 同源性最低, 为 86.3%。对编码的 129 kD、181 kD、移动蛋白 (MP)、外壳蛋白 (CP) 进行氨基酸序列同源性分析, 发现 129 kD 和 181 kD 复制相关蛋白与其他 TMV 分离物同源性分别为 94.5%~99.4%、95.5%~99.6%, 其中与来自中国山东的侵染本氏烟的分离物 Jimo 同源性最高, 分别为 99.4%、99.6%, 与来自美国的分离物 Ohio V 同源性最低, 分别为 94.5%、95.5%; MP 与来自韩国的分离物 IM 同源性最高, 为 99.6%, 与 TMV 其他分离物同源性为 88.0%~98.8%; CP 与来自韩国的分离物 IM、中国山东的分离物 Jimo 以及西班牙的分离物 WT-L2 同源性均为 100%, 与其他 TMV 分离物同源性为 95.6%~99.4%。综合分析 TMV 编码的这 4 种蛋白中, CP 最保守, 129 kD 和 181 kD 蛋白次之, MP 变异最大; 而 TMV-SXFQ 与 Ohio V 分离物同源性最低、亲缘关系最远。

表 2 TMV-SXFQ 与 Tobamovirus 中已报道的分离物核苷酸及氨基酸同源性比较结果

编号	分离物	病毒名称	GenBank 登录号	来源	宿主	核苷酸序列同源性/%	氨基酸序列同源性/%			
							129 kD	181 kD	移动蛋白 (MP)	外壳蛋白 (CP)
1	IM	TMV	AB369276	韩国	烟草	99.6	99.3	99.4	99.6	100.0
2	Jimo	TMV	HE818443	中国山东	烟草	99.3	99.4	99.6	98.8	100.0
3	Beipiao	TMV	HE818412	中国辽宁	烟草	97.9	99.0	99.3	97.7	99.4
4	Pingtian-2	TMV	HE818439	中国贵州	烟草	97.9	99.0	99.3	98.4	99.4
5	Xiongfian-2	TMV	HE818419	中国湖北	烟草	97.6	99.0	99.3	97.3	98.7
6	Chuxiong-1	TMV	HE818417	中国云南	烟草	94.8	97.9	98.5	96.9	99.4
7	Rakkyo	TMV	D63809	日本	—	94.0	96.6	97.3	96.1	96.2
8	pet-TW	TMV	EF392659	中国台湾	矮牵牛	86.3	94.9	95.7	89.5	95.6
9	Shanxi	TMV	JF920727	中国山西	烟草	97.9	98.7	99.1	98.4	98.7
10	Mangshi-2	TMV	HE818437	中国云南	烟草	97.9	99.0	99.3	98.1	98.7
11	TMV-152	TMV	AF395129	中国福建	—	97.8	98.9	99.2	96.9	99.4
12	Ohio V	TMV	FR878069	美国	—	86.3	94.5	95.5	88.0	95.6
13	WT-L2	TMV	KF972429	西班牙	—	99.5	99.2	99.4	98.4	100.0
14	Japanese	ReMV	AB628188	日本	辣椒	84.6	93.5	94.7	85.3	93.7
15	Henan	ReMV	EF375551	中国河南	地黄	83.8	92.8	93.8	86.8	95.0
16	Queensland	ToMV	AF332868	澳大利亚	番茄	79.2	90.9	91.6	78.3	83.6
17	N5	ToMV	GQ280794	中国浙江	番茄	78.9	90.8	91.4	78.3	83.6

为了确定 TMV-SXFQ 编码变异最大的 MP 变异情况, 将 TMV-SXFQ 的 MP 氨基酸序列与其同源关系比较高的 5 个分离物, 即韩国分离物 IM、中国山东分离物 Jimo、中国贵州分离物 Pingtian-2、中国山西分离物 Shanxi 以及西班牙分离物 WT-L2

的相应氨基酸序列进行比较分析, 发现在 MP 蛋白的氨基酸序列中存在 8 个氨基酸变异, 分别位于第 18、52、135、225、228、244、248、260 位 (图 6)。

2.5 TMV-SXFQ 系统进化分析

为了进一步研究 TMV-SXFQ 的起源与进化关

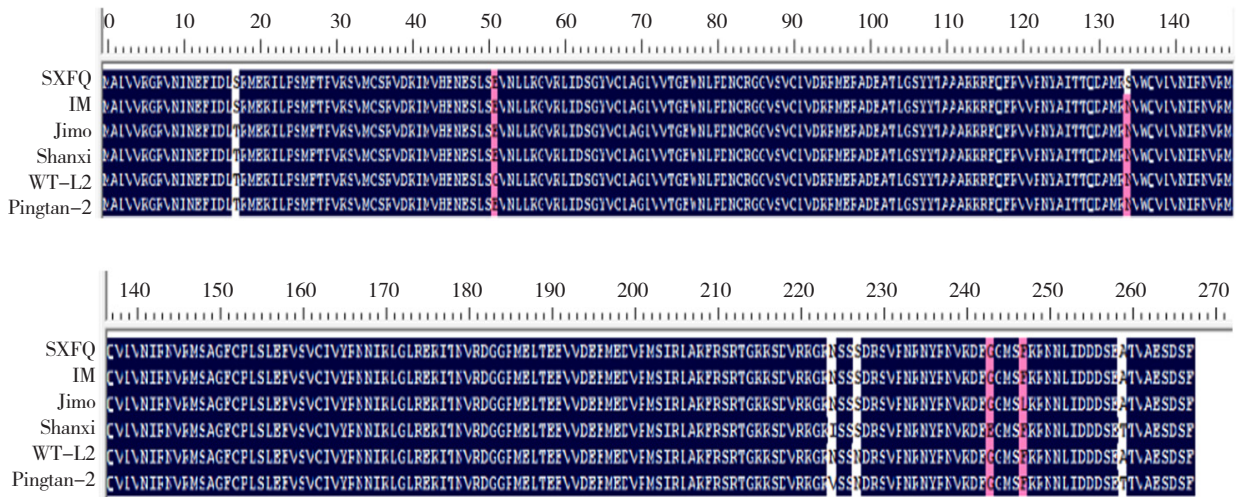


图6 TMV-SXFQ 与其同源关系比较高的 5 个分离物的 MP 氨基酸序列一致性分析结果

系，利用 MEGA 5.2 软件与已报道的其他烟草花叶病毒属分离物构建氨基酸序列的系统进化树。从图 7 可以看出，TMV-SXFQ 与其他 TMV 分离物形成一个大分支，其中与韩国分离物 IM 单独聚为一簇，亲缘关系最近，与中国台湾分离物 pet-TW 和美国分离物 Ohio V 亲缘关系最远；而 TMV-SXFQ 与烟草花叶病毒属其他分离物如地黄花叶病毒 (*Rehmannia mosaic virus*, ReMV) 和番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV) 的进化关系相对较远，这也进一步说明 TMV-SXFQ 为 TMV 分离物。

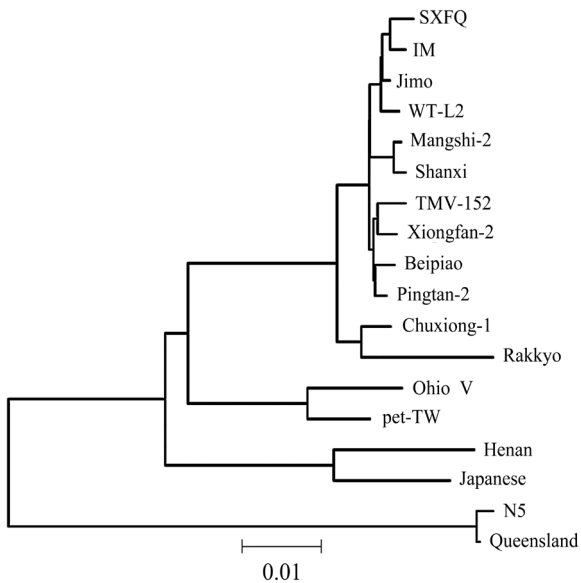


图7 TMV-SXFQ 与已报道的烟草花叶病毒属分离物的氨基酸序列系统进化树

3 结论与讨论

植物病毒是危害作物的主要病原物之一，烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 病毒在世界各地均有分布，寄主范围也特别广泛，可侵染茄科、十字花科、葫芦科、豆科、藜科、木犀科、苋科、菊科、商陆科等 36 科逾 300 种植物 (雷彩燕等, 2005; 侯红琴等, 2008; 黄永山和谭海文, 2013; 王德富等, 2016)。根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 第八次分类报告, *Tobamovirus* 有 22 个种和 1 个暂定种 (Briddon et al., 2005), 烟草花叶病毒作为烟草花叶病毒属的典型成员，早在 1892 年就被发现。目前 TMV 的株系很多，甚至在同一寄主上都会有不同的株系。过去，TMV 株系主要依据其侵染植物的症状与寄主范围来划分。但是，随着分子生物学的发展，对其基因组序列进行扩增和比较分析，可以发现不同株系间的微小差异，从而在不同寄主植物上不断获得 TMV 新株系 (雷彩燕等, 2005)。

本试验从山西省晋中市太谷县感病番茄中检测到烟草花叶病毒山西番茄分离物 (TMV-SXFQ)，进一步进行同源性和系统进化分析发现 TMV-SXFQ 与烟草花叶病毒属其他分离物的同源率为 86.3%~99.6%，其中 CP 最保守，MP 变异最大；系统进化分析显示 TMV-SXFQ 与韩国分离物 IM 单独聚为一簇，亲缘关系最近。通过对 TMV 不同株

系进行基因组结构及变异分析, 可以为抗病毒基因工程提供一定的理论与技术支持, 而 TMV-SXFQ 新株系全基因组的获得将为番茄病毒病的有效防治提供一定的参考依据。

参考文献

- 冯兰香, 蔡少华, 郑贵彬, 龙明生, 丁辛顺, 姚文岳, 郑品清, 高乔婉. 1987. 我国番茄病毒病的主要毒源种类和番茄上烟草花叶病毒株系的鉴定. 中国农业科学, 20 (3): 60-66.
- 侯红琴, 谭志琼, 张振臣. 2008. 烟草花叶病毒属研究新进展. 中国农学通报, 24 (5): 304-307.
- 黄永山, 谭海文. 2013. 烟草花叶病毒病的生物防治研究进展. 中国农业信息, (14): 25-27.
- 雷彩燕, 王振跃, 张振臣. 2005. 烟草花叶病毒株系研究进展. 河南农业科学, 34 (12): 14-16.
- 马兆红. 2017. 从生产市场需求谈我国番茄品种的变化趋势. 中国蔬菜, (3): 1-5.
- 牛颜冰, 王德富, 姚敏, 王贵军, 弓强. 2011a. 侵染苘麻的烟草花叶病毒鉴定. 植物保护学报, 38 (2): 187-188.
- 牛颜冰, 姚敏, 王德富, 王贵军, 弓强. 2011b. 臭椿病毒病原鉴定. 植物病理学报, 41 (4): 437-440.
- 牛颜冰, 时晓丽, 赵慧琪, 张西梅, 赵保佳. 2014. 白术矮化病毒病病原的分子鉴定和部分序列分析. 植物病理学报, 44 (4): 357-362.

- 牛颜冰, 时晓丽, 张西梅, 赵慧琪, 赵保佳. 2015. 侵染白术的蚕豆萎蔫病毒 2 号的分子检测与序列分析. 病毒学报, 31 (1): 58-64.
- 王德富, 张西梅, 杨锋, 牛颜冰. 2016. 油菜花叶病毒山西地黄分离物的全基因组序列测定与分析. 植物病理学报, 46 (5): 598-604.
- 张桂芝. 2011. 番茄病毒病的综合防治. 农业科技通讯, (2): 135-136.
- 赵黎明, 李刚, 刘永光, 国家进, 魏家鹏, 竺晓平. 2014. 番茄褪绿病毒与番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定. 中国蔬菜, (12): 15-20.
- 周建国, 肖启明, 刘双清, 周志成, 唐前君. 2013. 烟草花叶病毒病发生及防治研究进展. 安徽农业科学, 41 (1): 121-122.
- 周雪平, 钱秀红. 1996. 侵染番茄的番茄花叶病毒的研究. 中国病毒学, 11 (3): 268-276.
- Bridson R W, Ghabrial S, Lin N S, Palukaitis P, Scholthof K B G, Vetten H J. 2005. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses//International Committee on Taxonomy of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. [S. L.]: Elsevier Academic Press: 1009-1013.
- Tzanetakis I E, Martin R R. 2008. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. Journal of Virological Methods, 149 (1): 167-170.
- Zhao R N, Wang R, Wang N, Fan Z F, Zhou T. 2013. First report of *Tomato chlorosis virus* in China. Plant Disease, 97: 8.

Complete Whole Genome Sequence Measure and Analysis of *Tobacco mosaic virus* Infecting Tomato in Shanxi

PANG Xiao-jing¹, ZHAO Hui-qi¹, WANG De-fu¹, LIU Yong², NIU Yan-bing^{1*}

(¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; ²Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, Hunan, China)

Abstract: To identify the virus pathogen inducing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mosaic and curl disease at Jinzhong City of Shanxi Province, the technology of double-stranded RNA (dsRNA) and sequence-independent amplification (SIA) were used. Results of SIA and sequencing showed that there was *Tobacco mosaic virus* (TMV) in affected tomato leaves. Further cloning the whole genome sequence of TMV (TMV-SXFQ), the TMV-SXFQ was gained (GenBank No. JX993906), which was 6 394 bp in length and presented a typical *Tobamovirus* genome organization with 4 ORFs. Sequence comparative analysis showed that the homology of TMV-SXFQ and *Tobacco mosaic virus* and other isolates was 86.3%-99.6%. Phylogenetic analysis suggested that TMV-SXFQ isolates had closer ties consanguinity with IM strain from South Korea and these 2 isolates formed an independent branch.

Key words: Tomato; Pathogen identification; *Tobacco mosaic virus* (TMV); Sequence analysis