

黄瓜花叶病毒 (CMV) 2 个山西分离物 CP 序列测定及亚组分类分析

张璇¹, 赵慧琪¹, 王德富¹, 郭尚², 刘勇³, 牛颜冰^{1*}

(¹山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; ²山西省农业科学院食用菌研究所, 太原 030006;

³湖南省农科院植物保护研究所, 长沙 410125)

摘要:在生物学检测的基础上,利用酶联免疫检测、非序列依赖性 PCR(sequence-independent amplification, SIA)对感病番茄进行分子鉴定,表现卷叶和花叶症状的番茄均被黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV) 感染,分离物分别命名为 SXFQ(GenBank 登录号为 JX993914)和 FQ(GenBank 登录号为 JX993912)。为明确其分类地位,对二者外壳蛋白(coat protein, CP)进行克隆和测序分析。应用 DNAMAN 软件对本课题组前期检测的 7 个 CMV 山西分离物、SXFQ、FQ 以及其他 3 个 CMV 典型分离物 CP 序列进行比较分析,发现核苷酸和氨基酸序列最大相似性分别为 77.1%~100%和 81.6%~100%。氨基酸序列系统进化分析表明,9 个 CMV 山西分离物属于 CMV 亚组 I B 的 2 个分支,其中在指示植物上表现较强症状的 SXFQ 与其他 5 个分离物为一分支,在指示植物上表现较弱症状的 FQ 与其他 2 个分离物为另一分支。对 9 个山西分离物 CP 进行亚组分类分析,结果表明其理化性质、稳定性、疏水性与预测结果相近,2 个分支的分离物分别出现相近的氨基酸变异和蛋白结构,存在一定规律性。

关键词:番茄; 黄瓜花叶病毒; 序列分析; 亚组分类分析

Sequence and subgroup analysis of two new isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Shanxi ZHANG Xuan¹, ZHAO Hui-qi¹, WANG De-fu¹, GUO Shang², LIU Yong³, NIU Yan-bing¹ (¹College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ²Institute of Fungi, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China; ³Hunan Plant Protection Institute, Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China)

Abstract: To identify the viruses that may cause *Lycopersicon esculentum* malformations wrinkling disease, we used biological, serological and molecular methods. Results revealed that the virus associated with this disease was *Cucumber mosaic virus* (CMV). Two isolates were identified as SXFQ (GenBank accession number: JX993914) and FQ (GenBank accession number: JX993912). The identities of nucleotide and deduced amino acid sequences of CP gene among 9 CMV isolates of our research group and 3 other typical CMV isolates ranged from 77.1 % to 100 % and 81.6 % to 100 %, respectively. Phylogenetic trees based on the aa sequences showed that 9 CMV isolates of our laboratory belong to two branches of CMV subgroup I B. SXFQ and other 5 isolates belong to a branch which exhibits strong symptoms on the indicator plant. FQ and other 2 isolates belong to another branch which exhibits weak symptoms on the indicator plant. We analysed the subgroup of 9 Shanxi isolates CP. The results showed that the physical and chemical properties, stability and hydrophobicity were similar. The two branches showed similar amino acid variation and protein structure. It indicates that CMV isolates of the

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-05-17; 网络出版时间: 2017-05-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170525.1021.001.html>

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028)

通讯作者: 牛颜冰, 博士, 教授, 主要从事分子植物病毒学和中药 GAP 研究; E-mail: niuyanbingbest@163.com

第一作者: 张璇, 男, 硕士研究生, 主要从事分子植物病毒学研究; Tel: 183-3518-0189; E-mail: zx910829@126.com。

same branch of CMV subgroup I B had some nearly certain regularity.

Key words: *Lycopersicon esculentum*; *Cucumber mosaic virus*; sequencing; subgroup analysis

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)01-0035-11

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*)黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)的典型成员,能侵染 1 000 多种单、双子叶植物,可被 75 种蚜虫传播,有些分离物还可通过种子传播,具有寄主多、分布广等特点,是造成农作物危害最大的植物病毒之一^[1]。根据 CMV 寄主范围、致病性、血清学特性、CP 核酸序列分析等,将其株系或分离物大致分为 CMV 亚组 I 和 CMV 亚组 II。其中亚组 I 又可分为 CMV 亚组 I A 和 CMV 亚组 I B^[2],表明其存在显著遗传多样性。CMV 遗传多样性是由其基因组核苷酸序列变异和氨基酸序列差异所表现的,CMV *cp* 基因核苷酸序列分析能够较准确地反映其全基因组的变异情况,病毒氨基酸序列进化分析可以真实反映 CMV 株系差异的本质^[3,4]。

近年对山西省西葫芦^[5]、菜豆^[6]、白术^[7]等进行大范围调查,发现 CMV 侵染比较普遍,严重影响作物的产量和品质,但不同 CMV 分离物的基因组信息、系统进化关系及分子变异水平尚不清楚。为明确山西省 CMV *cp* 基因突变情况,本研究对山西 2 个 CMV 番茄分离物进行 *cp* 基因克隆、序列测定,结合本课题组已分离得到的 7 个 CMV 分离物和其他 3 个 CMV 典型分离物,对其进行核苷酸、氨基酸序列差异深入比较,并结合 GenBank 中其他 54 个 CMV 分离物氨基酸序列进行系统进化分析,随后根据生物信息学预测结果做进一步亚组分类分析,以期研究 CMV 株系鉴定、进化机制及致病作用提供参考,为有效防控山西省番茄病毒病提供可靠依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

具有明显卷叶(图 1-A)和花叶(图 1-B)症状的番茄叶片(各 5 份)采自山西太谷田间,同时采集健康番茄作为阴性对照。所有样品均保存于 -80℃ 冰箱备用。

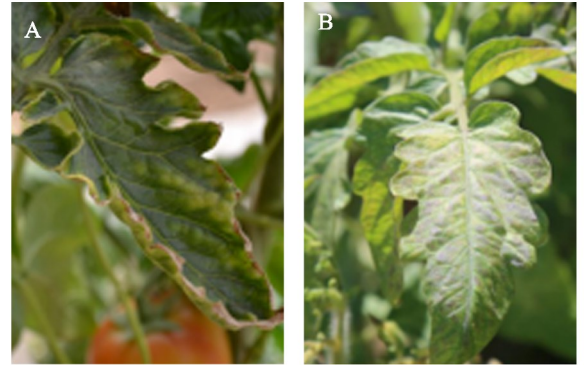


Fig. 1 Symptoms of *Lycopersicon esculentum* Mill. infected by viruses

A: Rolled leaf symptom; B: Mosaic leaf symptom.

1.2 方 法

1.2.1 生物学接种试验 参照 Niu 等^[8]的方法,取 10 份番茄感病叶片摩擦接种于指示植物苜蓿上,每份样品接种 3 株,以接种健康植株汁液的苜蓿为阴性对照。经 3 次单斑分离后将病斑摩擦接种于健康本氏烟上观察症状。

1.2.2 酶联免疫检测 参照 Zheng 等^[9]的方法并加以优化,对 10 份感病番茄样品进行斑点酶联免疫吸附检测。

1.2.3 植物病原 dsRNA 的提取 参照 Krajacic 等^[10]和 Tzanetakis 等^[11]的方法并加以修改,进行植物病原 dsRNA 的提取,并对其进行电泳检测。

1.2.4 非序列依赖性 PCR(SIA)和特异引物 PCR 检测 以 dsRNA 为模板,利用随机引物 XTN269 反转录得到 cDNA,再用随机引物 XTN177 进行 SIA 检测,PCR 反应体系和程序参照 Niu 等^[8]的方法进行。琼脂糖凝胶电泳检测与测序结果明确病毒病原后,再根据已报道序列设计特异引物进行 PCR 扩增。所使用的引物序列见表 1。

1.2.5 PCR 产物克隆及序列分析 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段,将其与 pMD18-T vector 进行连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 中,阳

Table 1 Sequences of primer pairs used for SIA and RT-PCR amplification

Primer name		Primer sequence (5'-3')
Universal primer	XTN269	GTTTTCCCAGTCACGAC(T) ₁₆
	XTN177	GTTTTCCCAGTCACGAC
	M13-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
	RV-M	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG
Specific primer	CMV- <i>cp</i> -F	ACGTCGACCATGGACAAATC
	CMV- <i>cp</i> -R	TACCCGGGTCAGACTGGTAGCACC

性克隆通过菌液 PCR 和酶切鉴定后送至上海生工公司进行测序。对测得序列结果进行 Blast 比对, 利用 DNAMAN 软件对获得序列、7 个 CMV 山西分离物及其他 3 个 CMV 典型分离物序列进行核苷酸、氨基酸序列相似性和差异性分析。上述分离物株系 (GenBank 登录号、寄主、来源地) 分别为: Am (JQ362394、白术、山西绛县)、CD (待登录、菜豆、山西壶关)、CMV-HH (JQ403531、红花、山西太谷)、SXCH (JX993913、柴胡、山西平遥)、WG (JQ403529、藿香、山西祁县)、XHL (JQ700201、西葫芦、山西榆次)、XHS (待登录、番茄、山西榆次)、YN (AJ239098、烟草、云南)、Fny (D10538、甜椒、美国)、lily (DQ885291、百合、云南)。运用 MEGA 7 软件构建氨基酸序列系统进化树, 以同属花生矮化病毒 (*Peanut stunt virus*, PSV) 为外群。

1.2.6 亚组分类分析 对供试 CMV CP 分离物及本实验室其他 CMV CP 分离物进行亚组分类分析。应用软件 ExPASy (Expert Protein Analysis System) 中的 Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>) 工具在线分析基本理化性质, Prot Scale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析疏水性, COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) 及 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 程序预测卷曲螺旋结构, TM-HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TM-HMM/>) 程序预测跨膜结构域, 蛋白序列紊乱区、球蛋白区预测使用 Glob Plot (<http://globplot.embl.de/>), 信号肽预测分析使用 Signal P3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0>), 磷酸化位点预测使用 NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)^[12, 13]。结合氨基酸序列比对和系统进化分析结果进一步分析。

2 结果与分析

2.1 生物学接种结果

疑似感病番茄病样叶片汁液摩擦接种在指示植物苋色藜上。3 次单斑分离后 30 份苋色藜呈现较为稳定的褪绿斑症状 (图 2), 符合病毒侵染的特点, 且被卷叶感病番茄侵染的 12 份苋色藜 (图 2-A) 发病症状较被花叶感病番茄侵染的 8 份苋色藜 (图 2-B) 严重。将上述 20 份苋色藜较为稳定的病斑汁液摩擦接种到 20 份健康本氏烟上。接种 10 d 后呈花叶症状, 被卷叶感病番茄病斑侵染的 12 份本氏烟 (图 2-D) 症状较被花叶感病番茄病斑侵染的 8 份本氏烟 (图 2-E) 严重。

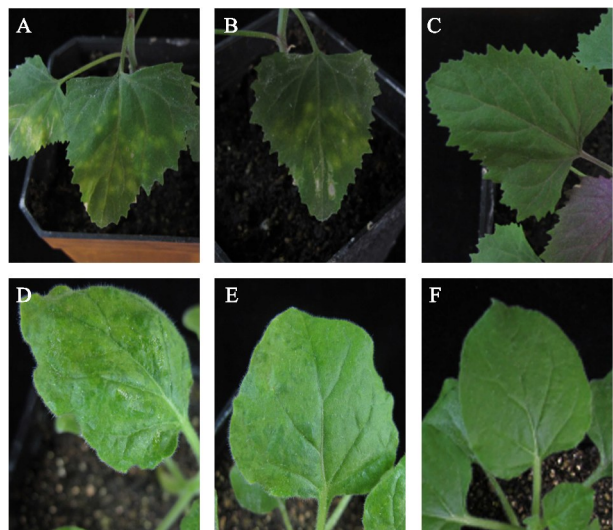


Fig. 2 Biological inoculation of indicator plants A-F: Healthy control, and diseased tomato plants with different symptoms were used in this study. A: With leaf roll; B: With leaf mosaic; C: Healthy control plant; D: Indicator plant with severe symptoms; E: Indicator plant with mild symptoms; F: Healthy control plant.

Table 2 The detection results of enzyme-linked immunoassay

Symptoms on tomato	Sum	Positive number	Positive detection rate/%
Leaf roll	5	4	80
Leaf mosaic	5	3	60

2.2 酶联免疫检测

对采集的 10 份疑似病样与 CMV 单克隆抗体进行酶联免疫检测(表 2)。由表 2 可见,5 份卷叶症状和 5 份花叶症状的阳性检出率分别为 80% 和 60%,总阳性检出率为 70%。

2.3 SIA 检测

以 XTN177 为引物,呈现卷叶症状和花叶症状病株叶片提取的 dsRNA 为模板进行 SIA 检测,分别得到 1 500 bp(图 3-A)和 503 bp(图 3-B)条带,而健康样品中则未扩增出任何片段。经测序后序列比对发现,2 个片段与其他 CMV 分离物

核苷酸序列相似性为 93%~100%,结合酶联免疫检测结果,证明番茄被 CMV 所侵染。将引起番茄卷叶症状分离物命名为 SXFQ,引起番茄花叶症状命名为 FQ。

2.4 特异引物 PCR 检测

为进一步确定 SXFQ 和 FQ 分类地位,以提取番茄感病叶片中 dsRNA 为模板,CMV-*cp*-F/CMV-*cp*-R(用于扩增 CMV *cp* 基因)为引物进行特异引物 PCR 检测。经测序后分别获得 CMV-SXFQ CP(图 4-A)全序列,大小为 496 bp(GenBank 登录号: JX993914);CMV-FQCP(图 4-B)全序列,大小为

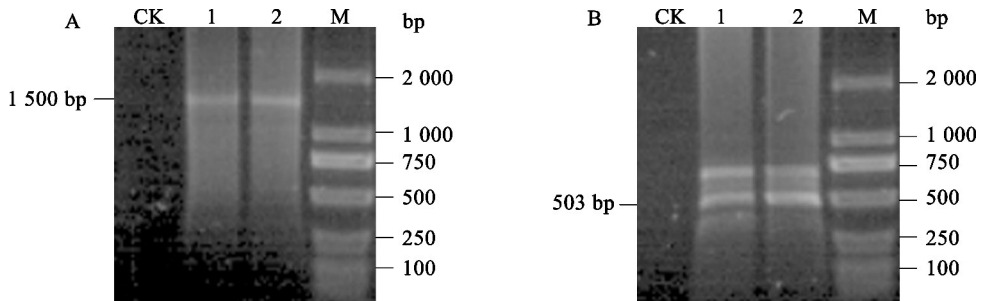


Fig. 3 Electrophoresis of SIA products

A: M, DL 2000TM DNA marker; CK, Healthy plant; 1-2, Rolled leaf plant.

B: M, DL 2000TM DNA marker; CK, Healthy plant; 1-2, Mosaic leaf plant.

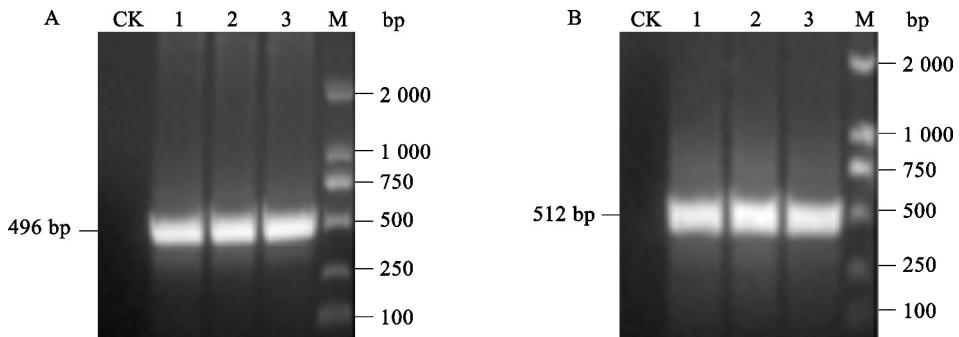


Fig. 4 Electrophoresis of RT-PCR products

A: RT-PCR product of SXFQ with primer set CMV-*cp*-F/CMV-*cp*-R; 1-3, Infected plants; CK, Healthy plants;

M, DL 2000TM DNA marker. B: RT-PCR product of FQ with primer set CMV-*cp*-F/CMV-*cp*-R; 1-3, Infected plants;

CK, Healthy plants; M, DL 2000TM DNA marker.

512 bp(GenBank 登录号:JX993912)。而健康样品中未扩增出片段。

2.5 CMV 序列相似性分析

利用 DNAMAN 软件对本实验室研究的 9 个来自山西不同地区不同宿主 CMV 分离物 CP (SXFQ、FQ、Am、CD、HH、SXCH、WG、XHL、XHS)和 3 个不同 CMV 典型分离物 (YN、Fny、Lily)进行核苷酸、氨基酸序列相似性比较分析。

核苷酸序列分析结果(表 3)表明,9 个 CMV 山西分离物 cp 基因均为 656 个核苷酸,相似性为 94.7%~100%,CD 分别与 HH 和 WG 的核苷酸序列相似性最低,HH 和 WG 核苷酸序列相似性最高。来自山西太谷的 SXFQ、FQ、HH 之间核苷酸序列相似性为 97.6%~98.0%,来自美国的分离物

Fny 和山西分离物 SXFQ 核苷酸序列相似性为 95.0%,来自云南的分离物 YN 和 Lily 核苷酸序列相似性为 77.8%,而 SXFQ 和 YN 核苷酸序列相似性为 95.3%,这表明来源地区与 CMV 分离物核苷酸序列不直接相关。来源于茄科的 SXFQ、FQ、XHS、YN 核苷酸序列相似性为 97.6%~99.2%,来源于菊科的 HH、Am 核苷酸序列相似性为 96.3%,来源于唇形科的 WG、葫芦科的 XHL、豆科的 CD 和伞形科的 SXCH 核苷酸序列相似性为 94.7%~98.5%,这表明 CMV 分离物核苷酸序列与寄主品种不直接相关。

氨基酸序列相似性分析结果(表 4)有不同的变化趋势。9 个 CMV 山西分离物氨基酸序列相似性为 95.9%~100%,其中 HH 和 WG 氨基酸序列相

Table 3 Identity analysis of nucleotide sequence of 12 CMV CP isolates/%

Isolate	SXFQ	FQ	Am	CD	HH	SXCH	WG	XHL	XHS	Fny	YN	Lily
SXFQ	100.0											
FQ	97.6	100.0										
Am	96.8	97.1	100.0									
CD	95.7	96.3	95.9	100.0								
HH	97.4	96.8	96.3	94.7	100.0							
SXCH	98.9	97.7	97.0	95.9	97.9	100.0						
WG	97.4	96.8	96.3	94.7	100.0	97.9	100.0					
XHL	98.3	98.0	97.0	95.6	97.9	98.5	97.9	100.0				
XHS	98.8	98.5	97.1	96.3	97.7	98.9	97.7	99.2	100.0			
Fny	95.0	94.5	93.6	94.0	93.3	94.2	93.3	94.2	94.6	100.0		
YN	95.3	94.5	93.6	93.4	93.3	94.8	93.3	94.5	95.0	94.8	100.0	
Lily	77.8	78.4	77.4	77.5	77.2	78.0	77.2	77.5	77.8	77.1	77.8	100.0

Table 4 Identity analysis of amino acid sequence of 12 CMV CP isolates/%

Isolate	SXFQ	FQ	Am	CD	HH	SXCH	WG	XHL	XHS	Fny	YN	Lily
SXFQ	100.0											
FQ	99.5	100.0										
Am	99.1	98.6	100.0									
CD	98.6	99.1	97.7	100.0								
HH	97.7	98.2	96.8	97.2	100.0							
SXCH	99.5	99.1	99.5	98.2	97.2	100.0						
WG	98.2	97.7	98.2	96.8	95.9	98.6	100.0					
XHL	99.5	99.1	98.6	98.2	97.2	99.1	97.7	100.0				
XHS	100.0	99.5	99.1	98.6	97.7	99.5	98.2	99.5	100.0			
Fny	98.2	98.6	97.2	97.7	96.8	97.7	96.3	97.7	98.2	100.0		
YN	98.6	99.1	97.7	99.1	97.2	98.2	96.8	98.2	98.6	97.7	100.0	
Lily	82.5	82.9	82.5	82.0	81.6	82.9	82.0	82.5	82.5	82.5	82.9	100.0

似性最低 (95.9%), XHS 和 SXFQ 氨基酸序列相似性最高 (100%)。来自山西晋中的分离物 SXFQ、FQ、HH 之间氨基酸序列相似性为 97.7%~99.5%, 山西榆次的 XHS、XHL 氨基酸序列相似性为 99.5%, 来自云南的 YN 和 Lily 氨基酸序列相似性为 82.9%, 而来自山西不同地区的 Am、WG、SXCH 氨基酸序列相似性为 98.6%~99.5%, SXFQ 和 YN 氨基酸序列相似性为 98.6%, 这表明不同地区不同 CMV 分离物氨基酸序列相似性不直接相关。来源于茄科的 SXFQ、FQ、XHS、YN 氨基酸序列相似性为 98.6%~100%, 来源于菊科的 HH、Am 氨基酸序列相似性为 96.8%, 来源于唇形科的 WG、葫芦科的 XHL、豆科的 CD 和伞形科的 SXCH 氨基

酸序列相似性为 96.8%~99.1%, 这表明 CMV 分离物氨基酸序列与寄主品种不直接相关。

为明确除 Lily 外 11 个 CMV 分离物所编码氨基酸的变异情况, 对其进行多重序列比对 (图 5), 发现存在多个氨基酸差异。将其所编码的主要差异氨基酸定位在 N 端 25-98 和 136-211 位氨基酸 2 个区域。在 CD 上 R³²→K、S⁷⁰→T、A¹³⁶→S, WG 上 K⁴³→R、I⁵²→L、I²⁰⁹→L、T²¹¹→Q, Am 上 I⁵²→L、M¹⁴¹→V、SXCH 上 I⁵²→L、FQ 上 S⁷⁰→T、HH 上 S⁷⁰→T、F¹⁴²→S、Y¹⁶⁷→H、D¹⁷⁸→N, XHL 上 T¹⁹⁵→A, Fny 上 S²⁵→P、K⁶⁵→R、S⁷¹→T、F⁹⁸→Y, YN 上 R³²→K、S⁷¹→T、I²⁰⁴→N 是其他分离物所没有的, SXFQ、XHS CP 氨基酸可能不存在差异。

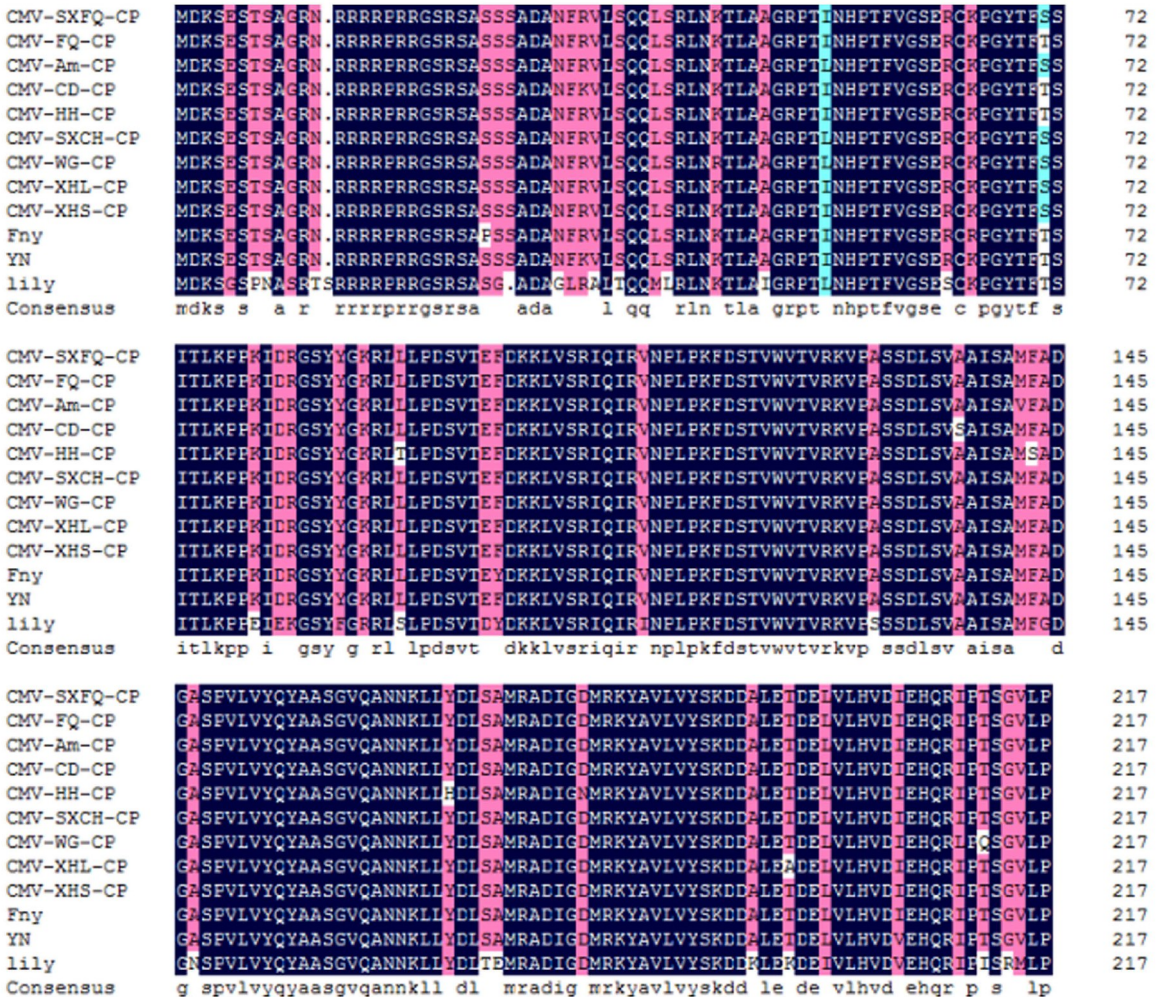


Fig. 5 Amino acid similarity of 12 CMV isolates

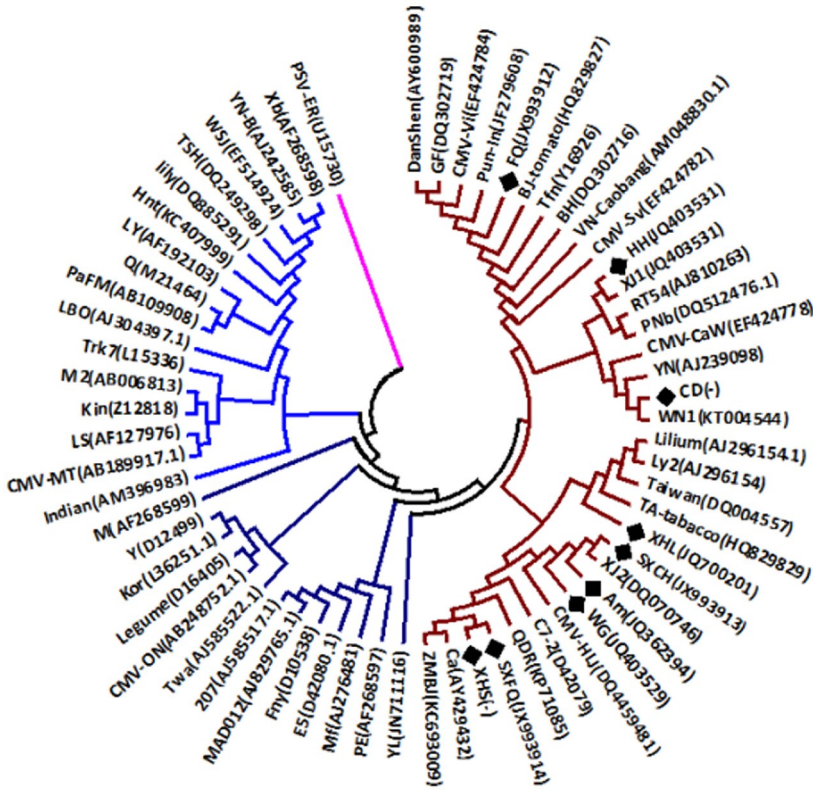


Fig. 6 Phylogenetic tree of CP amino acid sequence of 64 CMV isolates
 Diamond indicates 9 CMV CP isolates in our laboratory; Dark blue line represents Subgroup I A;
 Brown line represents Subgroup I B; Blue line represents Subgroup II; Pink line represents Outgroup.

2.6 系统进化分析

为了明确 9 个山西 CMV 分离物系统进化关系,利用 MEGA 7.0 软件,从 GenBank 中选取 54 个不同国家和寄主的分离物,并以 PSV-ER 为外群株系构建氨基酸序列系统进化树(图 6)。进化树分析结果显示 64 个分离物明显地分为 3 大组群,YN、Ca、XJ2、Ly2 等 47 个分离物亲缘关系较近与 CMV 亚组 I 聚为一支,Xb、YN-B、Hnt、Trk7、Hnt、LBO 等 16 个分离物亲缘关系较近与 CMV 亚组 II 聚为一支,两大分支与同属外群分离物 PSV-ER 构成系统进化树。CMV 亚组 I 又分为两组,其中 Fny、E5、PE 等 13 个分离物聚集成簇属于 CMV 亚组 I A,本实验室分离得到的 9 个 CMV CP 分离物与 Danshen、QDR 等 25 个分离物同属于 CMV 亚组 I B;而 CMV 亚组 I B 又分为 2 个分支,在指示植物上表现较强症状的 SXFQ 与 XHS、WG、Am、SXCH、XHL 亲缘关系较近聚为一簇,在指示植物上表现较弱症状的 FQ 与 HH、CD 亲缘关系较近聚

为一簇,表明两簇存在株系分化趋势。侵染番茄的 CMV 分离物中,SXFQ(JX993914, 中国山西)、FQ(JX993912, 中国山西)与 GF(DQ302719, 中国广东)、Tfn(Y16926, 中国天津)属于 CMV 亚组 I B,207(AJ585517, 澳大利亚)属于 CMV 亚组 I A, CMV-MT(AB189917, 日本)与 TSH(DQ249298, 中国浙江)属于 CMV 亚组 II,表明同寄主 CMV 分离物亲缘关系与来源地域无直接关系。4 个 CMV 日本分离物中,CMV-MT(AB189917, 番茄)属于 CMV 亚组 II,Y(D12499, 烟草)、Legume(D16405, 豇豆)、CMV-ON(AB248752、苦瓜)属于 CMV 亚组 I A,表明相同地域的 CMV 分离物亲缘性与寄主无直接关系。

2.7 亚组分类分析

2.7.1 生物信息学预测 利用 Prot Param、Prot Scale、COILS、TMHMM、Glob Plot、Signal P3.0、Net Phos 在线软件对 9 个 CMV CP 进行生物信息学预测分析(表 5、表 6、表 7),与先前系统进化分析相

Table 5 Analysis of the basic physical and chemical properties of CMV CP

Sequence name	Number of amino acids	Molecular weight	Theoretical pI	Instable index	Grand average of hydrophaticity	Aliphatic index	Formula
SXFQ	218	24072.49	9.95	45.16	-0.353	85.87	C ₁₀₅₉ H ₁₇₁₉ N ₃₁₁ O ₃₁₉ S ₅
FQ	218	24086.52	9.95	44.28	-0.352	85.87	C ₁₀₆₀ H ₁₇₂₁ N ₃₁₁ O ₃₁₉ S ₅
Am	218	24040.43	9.95	45.16	-0.345	87.20	C ₁₀₅₉ H ₁₇₁₉ N ₃₁₁ O ₃₁₉ S ₄
CD	218	24074.50	9.92	43.20	-0.361	85.41	C ₁₀₆₀ H ₁₇₂₁ N ₃₀₉ O ₃₂₀ S
SXCH	218	24072.49	9.95	45.16	-0.356	85.87	C ₁₀₅₉ H ₁₇₁₉ N ₃₁₁ O ₃₁₉ S ₅
WG	218	24127.53	9.99	47.99	-0.375	85.87	C ₁₀₆₀ H ₁₇₂₀ N ₃₁₄ O ₃₁₉ S
HH	218	23987.35	10.07	44.82	-0.398	84.08	C ₁₀₄₉ H ₁₇₁₂ N ₃₁₄ O ₃₁₉ S
XHL	218	24042.46	9.95	44.77	-0.341	86.33	C ₁₀₅₈ H ₁₇₁₇ N ₃₁₁ O ₃₁₈ S ₅
XHS	218	24072.49	9.95	45.16	-0.353	85.87	C ₁₀₅₉ H ₁₇₁₉ N ₃₁₁ O ₃₁₉ S ₅

Table 6 The estimated half-life and total number of residues of CMV CP

Sequence name	Estimated half-life/h			Total number of residues/%	
	<i>Mammalian reticulocytes, in vitro</i>	Yeast, <i>in vivo</i>	<i>Escherichia coli, in vivo</i>	Negatively charged (Asp + Glu)	Positively charged (Arg + Lys)
SXFQ	30	>20	>10	21	33
FQ	30	>20	>10	21	33
Am	30	>20	>10	21	33
CD	30	>20	>10	21	33
SXCH	30	>20	>10	21	33
WG	30	>20	>10	21	33
HH	30	>20	>10	20	33
XHL	30	>20	>10	21	33
XHS	30	>20	>10	21	33

Table 7 The phosphorylation sites and secondary structure of CMV CP

Sequence name	Phosphorylation sites			Secondary structure				
	Ser	Thr	Tyr	Helix/%	Strand/%	Coil/%	Disorder	Glob Doms
SXFQ	21	6	2	12.4	23.4	64.2	1-25, 50-85, 210-216	86-218
FQ	21	5	2	14.7	24.8	60.5	1-25, 50-85, 210-216	86-218
Am	21	7	2	12.4	22.5	65.1	1-25, 50-85, 210-216	86-218
CD	21	5	2	21.6	18.3	60.1	1-25, 50-85, 210-216	86-218
SXCH	20	6	2	12.4	20.6	67.0	1-25, 50-85, 210-216	86-218
WG	20	6	2	11.9	22.5	65.6	1-25, 50-85, 210-216	86-218
HH	23	6	1	16.5	19.3	64.2	1-25, 50-85, 210-216	86-218
XHL	21	5	2	12.4	23.4	64.2	1-25, 50-85, 210-216	86-218
XHS	21	6	2	12.4	23.4	64.2	1-25, 50-85, 210-216	86-218

一致,同属于 CMV 亚组 I B 的 9 个分离物的基本理化性质、摩尔消光系数、不稳定指数、脂肪系数、总平均疏水指数、半衰期、残基总数均相似;整条肽链均位于膜外,不存在跨膜区与信号肽结构;在 130~150 aa 处均有一个较强疏水区,这可能与核酸结合和病毒粒子组装有关,但其总平均疏水指数

均在 -0.341 至 -0.398 之间,均无显著疏水性; Strand(折叠)结构与 Coil(无规则卷曲)结构交替出现, Helix(螺旋)结构主要穿插于上述两种结构之间。

2.7.2 蛋白结构分析 通过上述蛋白质性质的预测,结合氨基酸序列比较分析,发现 CD CP 氨基酸

A¹³⁶→S 和 Am CP 氨基酸 M¹⁴¹→V 使螺旋结构向前移动一位;HH CP 中 Y¹⁶⁷→H 及 D¹⁷⁸→N 造成螺旋结构增多两组;HH CP 中 F¹⁴²→S 将原本的螺旋结构变为无规则卷曲结构;WG CP 中 I²⁰⁹→L 和 T²¹¹→Q 使折叠结构长度减少一位,说明氨基酸变异可能引起蛋白结构的变化;WG CP、SXCH CP、Am CP 中 I⁵²→L、XHL CP T¹⁹⁵→A、CD CP R³²→K、WG CP K⁴³→R 则未引起结构变化;在指示植物上表现较强症状的 SXFQ CP 与 XHS、WG、Am、SXCH、XHL 第 70 位氨基酸为 S;在指示植物上表现较弱症状的 FQ CP 与 HH CP、CD CP 的第 70 位氨基酸变异为 T,使折叠结构缩短并向后移动一位。同为 CMV 亚组 I B 相同分支的 WG、SXCH、Am 也有类似的蛋白结构。

3 讨论与结论

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)株系多,致病危害严重,是世界上最流行的植物病毒之一^[14-16]。分析病毒株系序列相似性及系统发育情况可准确了解其亲缘及进化关系,为比较序列差异提供依据^[17, 18]。生物信息学预测可为蛋白分离鉴定提供依据,并大大提高相关研究的工作效率^[19, 20]。因此,分析不同 CMV *cp* 基因的系统发育情况及亚组分类信息十分必要。本研究利用酶联免疫检测、SIA、RT-PCR 等方法分离得到 2 个 CMV 山西分离物(SXFQ 和 FQ),并结合本课题组先前研究的 7 个 CMV 山西分离物及其他 3 个 CMV 典型分离物序列进行序列差异比较和亚组分类综合分析。结果表明 9 个山西分离物 *cp* 基因全长 656 个核苷酸,不存在缺失、插入现象,序列相似性为 94.7%~100%;其编码 218 个氨基酸,序列相似性为 95.9%~100%。

植物病毒亚组归属往往与外壳蛋白基因相似性相关^[21]。本研究的 12 个 CMV 分离物中,来源地不同的 HH 和 WG 核苷酸序列相似性最高(100%),来源地相同的 YN 和 Lily 核苷酸序列相似性仅为 77.8%;侵染菊科寄主的 Am 和 HH 氨基酸序列相似性(96.8%)低于 CD(豆科)和 XHL(葫芦科)的氨基酸序列相似性(98.2%);系统进化树表明,来自中国太谷的 2 个 CMV 番茄分离物 SXFQ 和 FQ 属于 CMV 亚组 I B 的 2 个分支,表

明地域和寄主对 CMV 亲缘关系影响较少,与 Xi 等^[22]、Zhang 等^[23]的研究结果相似;其他侵染同寄主和来源同地区的 CMV 分离物分属 CMV 亚组 I A、CMV 亚组 I B 以及 CMV 亚组 II,这表明 CMV *cp* 基因序列和氨基酸序列的变异及分离物亲缘关系均与地区分布、寄主品种无关,与 Magome 等^[24]和 Song 等^[25]的研究结果相似。该 9 个 CMV 山西分离物与 XJ2(中国四川)、Danshen(中国河北)等 25 个分离物聚为一簇属于 CMV 亚组 I B;M(中国福建)等 13 个分离物属于 CMV 亚组 I A;Trk7(匈牙利)、Kin(英国)等 16 个 CMV 分离物聚为一簇属于 CMV 亚组 II。这进一步证明 CMV 亚组 I 在我国发生普遍,而 CMV 亚组 II 在我国发生较少,与 Takeshita 等^[26]、Stang 等^[27]的报道结果类似。

结合先前结果分析,对本课题组的 9 个 CMV 山西分离物进行生物信息学预测,各项预测结果近似,只有 HH 分离物的理论 pI 值相对较高,所含 C 和 H 数量相对较少;而 CD 分离物螺旋结构所占比例要高于折叠结构。结合氨基酸序列比较和螺旋结构所在位点分析,得出不同 CMV CP 中 A¹³⁶→S、M¹⁴¹→V、S⁷⁰→T、Y¹⁶⁷→H 及 D¹⁷⁸→N 等突变可能引起蛋白螺旋结构改变,与 Liang 等^[28]研究结果相似;结合系统进化树结果分析,聚为一簇的 FQ、HH、CD 二级结构 130~180 位之间出现多组螺旋卷曲结构,另一簇的 XHL、SXCH、Am、WG、SXFQ、XHS 只在 135~145 位存在一组螺旋卷曲结构,表明亚组分支与蛋白结构存在相关关系,与 Shi 等^[29]的研究相符。生物信息学预测结果也证明相近分布区域 CMV 分离物具有相似的性质。从微观方面推测个别差异结果可能与不同蛋白分子基团有关,与 Yang 等^[30]的研究结果类似。Tian 等^[31]和 Qin 等^[32]研究表明不同环境和寄主可能导致 CMV 保守基序氨基酸残基的变化并引起结构和功能的改变,不同 CMV 亚组分离物氨基酸差异可能与其致病性强弱有关。本研究对 9 个 CMV 山西分离物比较分析,发现其氨基酸序列存在差异。CMV 亚组 I B 不同分支的 SXFQ 与 FQ 经单斑分离后引起 20 份本氏烟症状强弱不同,与碱基突变 T²¹¹→A 相对应,第 70 位氨基酸在强、弱毒分离物之间存在差异,在指示植物上表现较强症状的 SXFQ 分离物为 S,在指示植物上表现较弱症状的 FQ 分离物为 T,推测该差异可能影响病毒的致病

性。花叶症状通常由病毒复合侵染引起^[33],其他病原鉴定以及致病症状和氨基酸差异的深入关系亟待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang H H, Lin Q Y, Xie L H, *et al.* The effects of three *Cucumber mosaic virus* isolates on the defendant enzymes and cell membrane permeability in tobacco cells (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2001, 31 (1) : 43-49.
- [2] Tian Z F, Qiu J Y, Ding C Z, *et al.* Cloning and sequencing of *Cucumber mosaic virus* coat protein gene from tomato (in Chinese) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2007, 22 (4) : 203-206.
- [3] Wahyuni W S, Dietzgen R G, Hanada K, *et al.* Serological and biological variation between and within subgroup Nand Q strains of *Cucumber mosaic virus* [J]. *Plant Pathology*, 1992, 41 (3) : 282-297.
- [4] Roossinck M J. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2 (2) : 59-63.
- [5] Wang D F, Shi X L, Kou L S, *et al.* Identification and partial sequence analysis of the pathogen causing *Cucurbita pepo* L. mosaic disease in Shanxi province (in Chinese) [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University* (山西农业大学学报), 2016, 36 (5) : 310-315.
- [6] Wang Q. Identification of viral pathogens infecting *Phaseolus vulgaris* L. and *Capsicum annuum* L. (in Chinese) [D]. Shanxi: Shanxi Agricultural University (山西:山西农业大学), 2014.
- [7] Zhao H Q. Identification and analysis of complete sequence of the viruses infecting *Atractylodes macrocephala* Koidz and *Solanum lycopersicum* Mill (in Chinese) [D]. Shanxi: Shanxi Agricultural University (山西:山西农业大学), 2013.
- [8] Niu Y B, Yao M, Wang D F, *et al.* Identification of the pathogenic virus on *Ailanthus altissima* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2011, 41 (4) : 437-440.
- [9] Zheng G Y, Wichai K, Gumpf X J. Detection of plant viruses using Dot-Immunobinding assay (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 1988, 4 (2) : 151-156.
- [10] Krajacic M, Ivancic-Jelecki J, Forcic D, *et al.* Purification of plant viral and satellite double-stranded RNAs on DEAE monoliths [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1144 (1) : 111-119.
- [11] Tzanetakis I E, Martin R R. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149 (1) : 167-170.
- [12] Zhang Y D, Zhao H R, Zhou Q, *et al.* Bioinformatics analysis of MP gene sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* Shaoyang isolate (in Chinese) [J]. *Genomics and Applied Biology* (基因组学与应用生物学), 2013, 32 (3) : 325-331.
- [13] Zhou Y, Zhang R, Guo S, *et al.* Molecular identification of viral pathogens inducing *Rehmannia luteola* mosaic disease in Beijing (in Chinese) [J]. *Journal of Plant Protection* (植物保护学报), 2010, 37 (5) : 447-452.
- [14] Xu Z, Barnett O W. Identification of a *Cucumber mosaic virus* strain from naturally infected peanut in China [J]. *Plant Disease*, 1983, 68 (10) : 386-389.
- [15] Zeng R, Chen Y F, Yan S J, *et al.* Complete sequence analysis of *Cucumber mosaic virus* CTL isolate (in Chinese) [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2008, 35 (2) : 213-220.
- [16] Niu Y B, Shi X L, Zhao H Q, *et al.* Molecular identification and partial sequence analysis of *Cucumber mosaic virus* isolate from *Atractylodes macrocephala* Koidz (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2014, 44 (4) : 357-362.
- [17] Xu S, Liu Q, Geng C, *et al.* Complete genomic sequences-based recombination and phylogenetic analysis of *Cucumber green mottle mosaic virus* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2016, 46 (3) : 320-327.
- [18] Liu Y, Mo X H, Yu Q, *et al.* Virus detection of tobacco mosaic disease and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Yunnan, Fujian and Hunan Provinces (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2006, 36 (4) : 310-313.
- [19] Zhao Q, Deng Y S, Ruan X L, *et al.* Bioinformatics

- analysis and antiserum preparation of prokaryotic expression protein of *Rice gall dwarf virus Pns9* gene (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2010, 31 (12) : 2153-2158.
- [20] Zhang Y T, Hu S H, Yan C X, *et al.* Bioinformatics prediction of micro RNAs in plant (in Chinese) [J]. Journal of Plant Genetic Resources (植物遗传资源学报), 2015, 16 (1) : 147-150.
- [21] Chen Y Z, Tan X Q, Zhu C H, *et al.* Sequence diversity analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from common crops in China (in Chinese) [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2016, 43 (3) : 427-433.
- [22] Xi D H, Lin H H, Xiang B C. Subgrouping identification and strain differentiation of two *Cucumber mosaic virus* isolates (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2006, 36 (3) : 232-237.
- [23] Zhang Z J, Wang D Y, Yu C M, *et al.* Analyzing the sequence and structure of two different coat protein genes of *Tobacco vein distorting virus* (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2016, 46 (2) : 241-246.
- [24] Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, *et al.* Molecular variability of the genomes of capilloviruses from Apple, Japanese pear, European pear, and Citrus trees [J]. Phytopathology, 1997, 87 (4) : 389-396.
- [25] Song Z, Liu K H, Yang F Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of the CP gene of *Citrus tatter leaf virus* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42 (10) : 3741-3748.
- [26] Takeshita M, Yoshinaga F, Choi H, *et al.* An isolate of *Cucumber mosaic virus* derived from a tomato fruit [C]. Japan: Kyushu University, 2004.
- [27] Stang A, Korn K, Wildner O, *et al.* Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR [J]. Journal of Clinic Microbiology, 2005, 43 (2) : 716-720.
- [28] Liang C Q, Meng Y, Luo L X, *et al.* Phylogenetic and bioinformatics analysis of replicase gene sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Virology (病毒学报), 2015, 31 (6) : 620-628.
- [29] Shi F Y, Gao F L, Shen J F, *et al.* Sequence variation of *PI* gene in *Potato virus Y* isolated from Fujian province (in Chinese) [J]. Hereditas (遗传), 2014, 36 (7) : 713-722.
- [30] Yang J G, Fan W H, Yang L Q, *et al.* Screening and the bioinformatics analysis of the *Nicotiana tabacum* L. TSWV-Resistant genes Chinese (in Chinese) [J]. Tobacco Science (中国烟草科学), 2016, 37 (4) : 60-67.
- [31] Tian Z F, Yu J L, Liu W C, *et al.* Comparative study on Bio-characteristics of *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup I and II (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica (华北农学报), 2009, 24 (5) : 201-205.
- [32] Qin R, Cheng W Y. Research progresses on *Cucumber mosaic virus* (in Chinese) [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Nat. Sci. Edition) [中南民族大学学报(自然科学版)], 2004, 23 (2) : 33-38.
- [33] Liu J L, Wang F T, Wei Y, *et al.* Cloning and sequence analyses of the coat protein genes of *Watermelon mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* from one mix-infected squash plant (in Chinese) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报), 2010, 26 (16) : 262-266.

责任编辑:于金枝