

大豆花叶病毒 5 个分离物的鉴定及外壳蛋白序列分析^{*}

郭东全 智海剑 王延伟 李海朝 盖钧镒 杨 华 李 凯 白 丽

(作物遗传与种质创新国家重点实验室/南京农业大学大豆研究所/国家大豆改良中心, 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 法扩增其外壳蛋白(CP)基因片段并进行测序, 结果表明: 5 个分离物 CP 基因全长均为 795 个核苷酸, 编码产生 265 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 91.1%~97.1%, 由此推导的氨基酸序列同源性为 98.1%~99.2%。结合 5 个分离物在 8 个大豆品种上的致病性反应得出, 5 个分离物在 8 个鉴别寄主上的致病性反应和序列差异的比较表明, 分离物在 8 个鉴别寄主上致病性反应相差越大, 其 CP 基因氨基酸序列差异就越大, 由此证实 SMV 的 CP 基因与致病性反应之间有一定的联系。

关键词 大豆花叶病毒; 外壳蛋白; 序列分析

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0218-05

大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV)是全球性大豆病害, 严重影响大豆的产量和品质。是马铃薯 Y 病毒属成员, 种子带毒是初侵染来源, 蚜虫非持久性传播形成再侵染。

目前国内外主要利用抗病性不同的鉴别寄主对大豆花叶病毒株系进行划分。由于所使用鉴别寄主不同, 形成不同的 SMV 株系划分体系^[1~8], 致病力不同的株系本质区别反映在 RNA 碱基序列上。最近 10 年, 国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV)对于植物病毒分类越来越多的采用分子分类标准, 特别是进化树分析已经成为植物病毒分类最重要的标准之一。目前已有多位研究者研究了大豆花叶病毒的全基因序列或部分序列, 并对核苷酸及氨基酸序列的同源性进行了比较^[9~14]。

本研究对 5 个不同来源的大豆花叶病毒分离物的外壳蛋白(CP)基因序列进行了分析, 研究了它们之间序列的同源性与在不同大豆品种上致病性反应之间的关系, 以探讨采用分子角度进行大豆花叶病毒株系划分的可行性。

1 材料与方法

1.1 病毒样品

5 个大豆花叶病毒病样于 2002~2003 年分别采集自河北沧州(CZ)、山东枣庄(ZZ)、山东潍坊(WF)、河北承德(CD)及河南郑州(ZHZZ), 在大豆品种南农 1138-2 上繁殖。

1.2 病样的分离纯化

生物纯化采用菜豆品种 Top-Crop, 将第一对真叶充分展开的菜豆幼苗在黑暗条件下培养 24h, 把待分离的病样摩擦接种在离体的 Top-Crop 真叶上, 置于人工气候箱内保湿培养。待产生稳定枯斑后把单个枯斑回接种在南农 1138-2 上繁殖。

1.3 血清学测定

血清学检测采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA), 按常规方法进行, 阴性对照为健康的南农 1138-2, 阳性对照为本单位保存的 Sa 和 Sc-3 株系。

1.4 品种反应

采用常规摩擦接种方法将 5 个 SMV 分离物分

^{*} 收稿日期: 2006-01-23

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划; 国家自然科学基金资助项目(30571176); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004100)

作者简介: 郭东全(1979-), 男, 硕士研究生, 从事大豆抗病遗传育种研究。

联系作者: 智海剑, Tel: 025-84396463; E-mail: zhj@njau.edu.cn。

别接种在 8 个大豆品种上, 接种后 30 天内, 连续观察并记录各品种对 5 个分离物的抗感反应。

1.5 RT-PCR

1.5.1 引物设计 根据已经报道的美国 SMV 株系 G7(GenBank 登录号 AF241739) 及中国 HZ 分离物(GenBank 登录号 AJ312439)的序列设计引物。由上海博亚生物技术公司合成。

P₁: 5'- ATGCTCAGACAAGTGAGCT 3'
P₂: 5'- CTCCCTGCCATTTCATAAAG 3'

为了保证 PCR 产物测序的准确性和 CP 基因的完整性, 在 CP 基因的两端各保留了一段序列, 因此, 预期的目的片段长度为 1000bp 左右。

1.5.2 总 RNA 的提取 采用天为时代公司植物总 RNA 提取试剂盒提取感病叶片的总 RNA, 采用健康的南农 1138-2 叶片作为阴性对照。

1.5.3 反转录与 cDNA 扩增 采用宝生物工程(大连)有限公司的 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)

Ver. 3.0 试剂盒在同一个反应管中进行。反转录体系及条件参照说明书进行。扩增反应条件: 94℃变性 2min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 30 个循环。

1.6 测序及序列分析

PCR 产物经纯化后由上海博亚生物技术有限公司进行双向测序。序列分析主要采用 DNASTar 及 BioEdit 软件。

2 结果与分析

2.1 分离纯化及血清学检测结果

5 个病样均能在 Top Crop 上产生稳定的枯斑, 将单个枯斑回接到南农 1138-2 上得到每个病样纯化的分离物, 每个分离物的血清学检测结果均呈阳性。

2.2 各分离物在不同大豆品种上的反应

将 5 个纯化后的分离物接种在 8 个大豆品种

表 1 5 个 SMV 分离物在 8 个大豆品种上的反应
Table 1 Reaction of 5 SMV isolates to 8 differential hosts

分离物	南农 1138-2	诱变 30	Davis	Buffalo	早熟 18	Kwanggyo	齐黄 1 号	科丰 1 号
	Nannong1138-2	Youbian30			Zaoshu18		Qihuang1	Kefeng 1
CZ	S	R	R	R	R	R	R	R
ZHHZ	S	S	S	S	S	R	R	R
ZZ	S	S	S	S	S	S	R	R
CD	S	S	S	S	S	S	R	R
WF	S	S	S	S	S	S	S	S

注: R-抗病; S-感病
Note: R-Resistant; S- susceptible

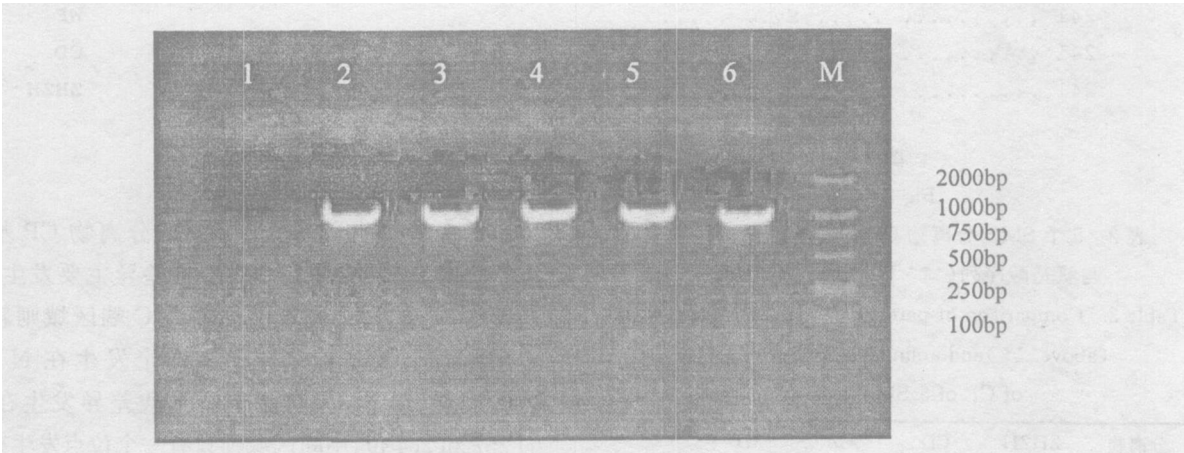


图 1 CP 基因 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig 1 RT-PCR products in agrosegel of CP

1: CK; 2: CZ; 3: ZZ; 4: WF; 5: CD; 6: ZHHZ; M: DNA marker

上, 8 个品种对各分离物的致病性反应见表 1。其中 CZ 分离物只能侵染南农 1138-2, 而 WF 分离物能

够侵染全部 8 个品种; ZZ 和 CD 两个分离物在 8 个品种上的致病性反应则完全相同。

2.3 外壳蛋白基因 cDNA 的扩增

以各分离物反转录得到的 cDNA 第一链为模板, 分别扩增其 CP 基因。5 个分离物均得到 1000bp 左右的目的片段, 和预期片段大小一致, 对照在此位置没有条带(图 1)。

2.4 序列分析

序列分析结果表明, 5 个分离物的 CP 基因均由 795 个碱基组成, 编码 265 个氨基酸(图 2)。核苷酸序列同源性的 91.1%~97.1%, 由此推测的氨基酸序列同源性为 98.1%~99.2%(表 2)。

1	SGKEKEGDMD	AGKDPKKSTS	SGKGAGTSNK	DVNVGSKGKV	VPRLQKITRK	MNLPMVEGKI	CZ
1S.....S.	ZZ
1N.....S.....A.S.	WF
1S.....S.	CD
1S.....S.	ZHZH
61	ILSLDHLLEY	KPNQVDLFNT	RATRTQFEAW	YNAVKDEYEL	DDEQMGVVMN	GFMVWCIDNG	CZ
61T.	ZZ
61	WF
61	CD
61	ZHZH
121	TSPDANGVWV	MMDGEEQIEY	PLKPIVENAK	PTLRQIMHHF	SDAAEAYIEM	RNSESPLYMPR	CZ
121	ZZ
121	WF
121	CD
121	ZHZH
181	YGLLRNLRDR	ELARYAFDFY	EVTSTKPNRA	REAIAQMKAA	ALSGVNNKLF	GLDGNISTNS	CZ
181	ZZ
181	WF
181	CD
181	ZHZH
241	ENTERHTARD	VNQNMHTLLG	MGPQQ				CZ
241				ZZ
241S.....				WF
241S.....				CD
241P.				ZHZH

图 2 5 个 SMV 分离物外壳蛋白基因编码的氨基酸序列及其比较

Fig 2 Comparison of the amino acid sequences of CP of 5 SMV isolates

表 2 5 个 SMV 分离物 CP 基因核苷酸(***上)与氨基酸序列(***下)同源性比较(%)

Table 2 Comparison of percentage identical nucleotides (above ***) and amino acids (below ***) of CP of 5 SMV isolates

分离物	ZHZH	CD	CZ	WF	ZZ
ZHZH	***	92.6	97.1	91.1	95.2
CD	99.2	***	93.2	96.2	93.1
CZ	98.9	98.9	***	91.7	95.3
WF	98.5	99.2	98.1	***	91.3
ZZ	99.2	99.2	98.9	98.5	***

本实验所测定的 5 个 SMV 分离物 CP 基因共有七个氨基酸存在编码差异, 且差异主要发生在 CP 基因的 N 端区域, 而中间区域和 C 端区域则较为保守。如七个氨基酸差异中有四个发生在 N 端, 即 18、22、27、29 位, 只有两个氨基酸差异发生在 C 端的 257 和 264 位, 中间区域则只有一个位点发生差异。

分离物 CD 和 ZZ 的 CP 基因只有 2 个氨基酸的差异, 同源性高达 99.2%, 它们在 8 个大豆品种上的致病性反应也基本相同。分离物 CZ 与 WF 在 8 个大豆品种上的致病性反应相差较大, 在 CP 基因上则存在 5 个氨基酸差异, 同源性仅为 98.1%。另外,

分离物 ZHHZ 与 CD、ZZ 只在 Kwanggyo 上存在症状反应的差异, CP 基因氨基酸则只分别存在两个氨基酸的差异, 同源性均为 99.2%。以上结果表明, 在鉴别寄主上致病性反应相差越大的分离物, 其 CP 基因氨基酸序列差异也就越大, 进一步证实了 SMV 的 CP 基因与症状表现之间有较密切的联系。

3 讨论

目前对植物病毒的株系划分大多是根据在鉴别寄主上的症状反应来进行。寄主对株系的症状反应除了与病毒的株系、大豆品种有关外, 还常常受环境特别是温度等一些不确定因素的影响。另外, 不同研究者对症状的描述也存在一定差异, 这都会对株系的划分结果造成一定影响。因此, 精确的株系划分体系应该建立在病毒的分子水平上, 对病毒的核苷酸及氨基酸序列进行比较研究。目前已有多位研究者研究了大豆花叶病毒的全基因序列或部分序列, 并对核苷酸及氨基酸序列的同源性进行了比较。虽然国际病毒分类委员会第七次病毒分类报告中明确规定了马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)病毒种和株系的划分标准, 即病毒外壳蛋白(CP)氨基酸序列同源性小于 85%, 属于不同种类的病毒; 大于 85%, 则属于同种病毒的不同株系。但是它对不同株系进行划分的具体阈值却没有规定, 因此如何将序列同源性比较应用于株系的划分目前还没有统一的定论。

大豆花叶病毒基因组结构中各种功能蛋白的作用还没有完全了解, 具体由哪几种蛋白或哪几个氨基酸决定病毒在寄主上的症状还不完全清楚, 因此, 根据序列的同源性来进行 SMV 的株系划分仍需进一步研究, 目前只能和传统的症状反应结合起来作为参考。

另外, 将本实验 5 个 SMV 分离物的 CP 基因氨基酸序列与国内外其他已报道的 SMV 分离物进行了比较, 结果表明, 30 个 SMV 分离物的 CP 基因核苷酸序列同源性为 90.1%~100.0%, 由此推导的氨基酸序列同源性高达 94.7%~100.0%, 说明

SMV 外壳蛋白基因是一个高度保守的区域, 这对于利用病毒的外壳蛋白介导的抗病品种选育具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Chao E K, Goodman R M. Strains of soybean mosaic virus classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology*. 1979, 69 (5): 467-470
- 2 濮祖芹, 曹琪, 房德纯. 大豆花叶病毒的株系鉴定[J]. *植物保护学报*, 1982, 9(1): 15-19
- 3 陈永萱, 薛宝娣, 胡蕴珠, 等. 大豆花叶病毒(SMV)两个新株系的鉴定[J]. *植物保护学报*, 1986, 13(4): 221-226
- 4 吕文清, 张明厚, 魏培文. 东北三省大豆花叶病毒(SMV)株系的种类与分布[J]. *植物病理学报*, 1985, 15(4): 225-228
- 5 张明厚, 魏培文, 张春泉. 我国东北五省市 SMV 对大豆主栽品种的毒力测定[J]. *植物病理学报*, 1998, 28(3): 237-242.
- 6 罗瑞梧, 尚佑芬, 杨崇良. 山东省大豆花叶病毒株系鉴定[J]. *山东农业科学*, 1990, (5): 16-19
- 7 尚佑芬, 赵玖华, 杨崇良, 等. 黄淮地区大豆花叶病毒株系鉴定[J]. *山东农业科学*, 1997, (6): 24-27.
- 8 王修强, 盖钧镒, 濮祖芹. 黄淮和长江中下游地区大豆花叶病毒株系鉴定与分布[J]. *大豆科学*, 2003, 22(2): 102-107.
- 9 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
- 10 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*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus[J]. *Journal of General Virology*, 1989, 70: 1853-1860
- 11 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
- 12 储瑞银, 冷晓红, 鲍一明. 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.
- 13 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.
- 14 黎昊雁, 陈炯, 陈剑平. 大豆花叶病毒杭州分离物基因组全序列测定及其结构分析[J]. *科技通报*, 2003, 3(2): 90-93.
- 15 Atreya P L, Atueya C D, Pirone T P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 7887-7891.

IDENTIFICATION AND SEQUENCE ANALYSIS OF COAT PROTEIN GENE OF FIVE SOYBEAN MOSAIC VIRUS ISOLATES

Guo Dongquan Zhi Haijian Wang Yanwei Li Haichao Yang Hua Li Kai
Bai Li Gai Junyi

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University, National Center for Soybean Improvement Key Laboratory of Gop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095)

Abstract 5 SMV isolates were obtained by using biological purification and serology (DAS-ELISA). The coat protein gene regions were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequences analysis showed that CP gene of the each SMV isolates had 795 nucleotides in length, encoding 265 amino acids. Comparison of the sequences of CP genes between different isolates showed they shared 91.1%~97.1% nucleotide acids identities and 98.1%~99.2% amino acids identities with each other. The results also revealed that there was significant correlation between CP genes of SMV and symptom reaction of SMV on differential Hosts.

Key words Soybean mosaic virus; Coat protein gene; Sequence analysis

欢迎订阅 2007 年《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性学术期刊,是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊、“中国期刊方阵”期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊。本刊坚持以高实效为原则,以服务科研、服务生产为宗旨,主要报道最新的农业科研成果、先进技术、发展趋势以及新产品、新品种等,能够全面反映黑龙江省特色、内容丰富、栏目新颖、信息量大、可读性强。设有作物育种、耕作栽培、土壤肥料、植物保护、园艺、质量安全、畜牧兽医、农业经济、综述、实用技术、信息等栏目以及各类广告业务宣传,如:新品种、新产品、重点实验室、研究所、企业简介等。本刊发行面广,读者群大:农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广部门的科技人员、管理干部和广大农民群众等。

本刊为国际大十六开本,彩色四封,80 页,双月刊,刊号:ISSN 1002-2767, CN 23-1204/S,邮发代号 14-61,广告经营许可证号:2301004010072,单月 10 日出版,每期定价 8.00 元,全年 48.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。

地 址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《黑龙江农业科学》编辑部

邮编:150086 电 话:0451-86668373 E-mail:nykx13579@sina.com

《安徽农学通报》征订及地址变更启事

《安徽农学通报》是由安徽省农学会主办,安徽省作物学会协办的综合性农业科技期刊,是《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录期刊,以文字版和电子版两种形式向国内外公开发行人,刊号:ISSN 1007-7731 CN 34-1148/S。融学术性、指导性、实用性于一体,既刊登作物栽培与育种、植物保护、土壤肥料、园艺、蚕桑、茶园、畜牧、水产及其他农业科学的硬科学研究报告、综述、研究简报和实用技术;也发表农业经济、农业科技管理、农业发展战略、农产品加工及农业产业化等方面研究论文、调查报告和对策性文章。

《安徽农学通报》是各级农业行政管理、科研教育、技术推广、种子生产营销等单位和个人必备的技术指南。月刊、大 16 开,80 页,每册 4 元。全年 48 元,全国邮局征订,邮发代号 26-146;也可直接汇款到编辑部订阅。

编辑部地址:合肥市美菱大道 421 号省农委《安徽农学通报》编辑部

邮编:230001 联系电话:0551-2675980 3214796(小灵通)

电子邮件信箱: nxb_z@yahoo.com.cn; ahnxb_z@163.com http://ahnxb.chinajournal.net.cn