

中国大豆花叶病毒 *HC-Pro* 基因的克隆与序列分析

刘 宁^{1,2}, 刘若淼¹, 马 莹¹, 王大刚¹, 智海剑¹

(1. 南京农业大学 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; 2. 烟台出入境检验检疫局技术中心, 山东 烟台 264000)

摘 要:通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR), 克隆了我国 6 个大豆花叶病毒(SMV)分离物的 *HC-Pro* 基因全长 cDNA, 并测定了其全序列, 探索其与病毒致病性和交叉保护作用的关系。结果表明: *HC-Pro* 基因全长为 1371nt, 编码的 *HC-Pro* 蛋白为 457 个氨基酸, 其中包含与病毒移动有关的 CCC 基序、与蚜传相关的 PTK 基序等功能结构域。6 个 SMV 分离物的 *HC-Pro* 基因核苷酸序列同源性为 89.2% ~ 99.9%, 由此推导的氨基酸序列同源性为 95.4% ~ 99.8%, 其中 SMV 分离物 TS216 和 4434 仅有 1 个碱基差异。将序列信息与 6 个 SMV 分离物在 10 个鉴别寄主上的症状反应以及分离物间的交叉保护作用进行综合分析发现, *HC-Pro* 基因同源性高的 SMV 分离物在鉴别寄主上的致病性反应没有明显的相似性, 而 *HC-Pro* 基因同源性高、亲缘关系近的部分 SMV 分离物之间交叉保护作用明显。结果证明 6 个 SMV 分离物的 *HC-Pro* 基因高度同源, 同源性高低与其在鉴别寄主上的致病性反应没有明显联系, 但同源性高、亲缘关系近的分离物间交叉保护作用可能较强。

关键词:大豆花叶病毒; *HC-Pro* 基因; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)04-0549-06

Cloning and Sequence Analysis of *HC-Pro* Gene of Soybean Mosaic Virus

LIU Ning^{1,2}, LIU Ruo-miao¹, MA Ying¹, WANG Da-gang¹, ZHI Hai-jian¹

(1. National Center for Soybean Improvement of Nanjing Agricultural University, National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Jiangsu; 2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, Shandong, China)

Abstract: This study aims to clone and sequence full-length cDNA of *HC-Pro* gene of six SMV isolates using RT-PCR, to observe the reaction of six SMV isolates to ten hosts, and to discuss the relationships between similarity of the gene sequence and virus virulence, effect of cross-protection. The results showed that full-length cDNA of *HC-Pro* gene had 1371 nucleotides encoding 457 amino acids. The protein *HC-Pro* had functional domains such as the CCC motif related to virus movement and the PTK motif related to spread by aphids. Homologies of six SMV isolates nucleotides were 89.2% ~ 99.9% and amino acids were 95.4% ~ 99.8%. There was one different nucleotide in sequence of *HC-Pro* gene between TS216 and 4434. No certain relationship was found between homology of *HC-Pro* gene of six SMV isolates and their virulence. While, homology of SMV isolates determined effects of cross-protection to a certain extent.

Key words: Soybean mosaic virus; *HC-Pro* gene; Gene cloning; Sequence analysis

大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus, SMV)是一种全球性大豆病害,严重影响大豆产量和品质,甚至造成绝产。病毒侵入大豆植株后,通过细胞间移动和长距离运输引起系统性侵染。病毒的运动除受寄主因子影响外,还受到病毒本身编码的运动蛋白(Movement protein, MP)控制^[1]。由于不同病毒的 MP 功能相似,以 MP 突变基因转化的植株抗性强且抗谱广^[2],因此利用缺陷或异源的 MP 介导广谱病毒抗性的设想使得转一种基因而抗多种病毒成为可能。SMV 的 *HC-Pro*(helper component pro-

teinase, 辅助成分蛋白酶)蛋白属于运动蛋白^[3],其参与病毒生活史的各个环节,因此深入研究 *HC-Pro* 基因对防治 SMV 有着现实意义。到目前为止,转外壳蛋白(CP)或复制酶(NlB)基因的抗病毒植株均有报道,而病毒 MP 介导的抗性运用未见报道,这是由于筛选突变的无功能 MP 基因难度较大^[4]。因此深入了解 MP 的结构和功能,有助于利用突变的无功能 MP 进行抗病毒转基因植株的培育。该研究旨在克隆来源不同的 SMV 分离物的 *HC-Pro* 基因,通过其氨基酸或核苷酸的变异分析,探讨 SMV 分离物

收稿日期: 2010-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971815); 国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A04); 国家高技术研究发展计划资助项目(2006A10A111); 农业部大豆产业技术体系(nycyt-04); 高等学校创新引智计划资助项目(B08025); 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-004)。

第一作者简介: 刘宁(1982-), 女, 助理工程师, 硕士, 现主要从事植物检验检疫工作。

通讯作者: 智海剑, 教授, 博士生导师。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

间致病力、交叉保护作用的差异与 *HC-Pro* 基因同源性的关系,为探讨该基因的变异对其功能的影响以及大豆抗病毒基因工程等打下基础。并探讨根据 *HC-Pro* 基因序列变异划分 SMV 株系的可能。

1 材料与方法

1.1 供试材料

6 个 SMV 分离物以及 10 个鉴别寄主(表 1)均由南京农业大学国家大豆改良中心提供。SMV 分离物在南农 1138-2 上繁殖保存。

试验所用 RNA 提取试剂盒购自北京天为时代公司,Ex Taq DNA 聚合酶、AMV 反转录酶和 DNA 分子量标准购自 TaKaRa 公司,pEGM-T Easy 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 Biofux 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 SMV 接种及症状反应的观察 2007 年 9 月~10 月在南京农业大学防虫网室中盆播大豆品种,第 1 对真叶展开时采用常规摩擦接种方法将 6 个 SMV 分离物分别接种到 10 个大豆鉴别寄主上,接种后 20 d 观察并记录各品种的症状反应。

1.2.2 cDNA 的合成及 *HC-Pro* 基因的 PCR 扩增 取接种 SMV14 d 后的南农 1138-2 感病叶片 0.1g,在液氮中磨碎,按 TIANGEN 试剂盒说明书提取总 RNA,以不接种的健康叶片为阴性对照。根据已报道 G7 (Genbank 登录号 AF241739)、G7H (Genbank 登录号 AY294045)、Y5 (Genbank 登录号 AJ310200)

和 Hangzhou (Genbank 登录号 AJ312439) 全长序列设计引物,由上海英骏公司合成。引物序列如下:

HC-F: 5'-GATATTTCAGGAATTCTCCCAAATC-CTGAAG-3'

HC-R: 5'-CTGTCCCTCGAGCTAACCAACTCTGTAGAATTTTC-3'

1.2.3 *HC-Pro* 基因的克隆 采用 Biofux 公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,采用 Promega 公司 T4 DNA 连接酶将回收产物连入 pEGM-T Easy 载体,加入到 CaCl_2 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 平板上挑取白色重组菌落后培养。

1.2.4 DNA 序列测定及分析 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送由上海英骏公司进行双向测序。测序结果采用 Clustal x 及 Genedoc 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 品种反应

6 个 SMV 分离物在 10 个鉴别寄主上的症状反应见表 1。从表 1 可以看出,SMV 分离物在大豆植株上的症状主要表现为花叶和坏死,或 2 类症状同时出现。同一病毒分离物侵染不同品种或同一品种感染不同分离物均可产生不同的症状,病毒和大豆品种之间存在互作。

表 1 6 个 SMV 分离物在鉴别寄主上的症状反应
Table1 Reaction of ten hosts to six SMV isolates

| 鉴别寄主 | SMV 分离物 SMV isolate | | | | |
|-------------------------|---------------------|-------|------|-------|-------------|
| Host | DB604 | BJ157 | 4434 | TS216 | CZ2176517-3 |
| 南农 1138-2 Nannong1138-2 | -/M | -/M | -/M | -/M | -/M |
| 诱变 30 Youbian30 | -/M | -/MN | N/N | -/M | -/M |
| 8101 | -/M | N/M | -/M | -/M | -/M |
| 铁丰 25 Tiefeng25 | -/M | -/M | -/N | -/M | -/M |
| Davis | -/M | -/N | N/MN | -/M | -/M |
| Buffalo | -/M | N/MN | N/MN | -/MN | -/M |
| 早熟 18 Zaoshu18 | -/- | -/M | N/N | -/M | -/M |
| Kwanggyo | -/M | N/M | -/MN | -/M | N/N |
| 齐黄 1 号 Qihuang No1 | -/- | -/- | -/M | -/- | -/M |
| 科丰 1 号 Kefeng No1 | -/- | -/- | -/M | -/- | -/M |

接种叶反应/上位叶反应;M 为花叶,N 为坏死,-为无症状。

Reaction of inoculated leaves/ Reaction of upper leaves; M—Mosaic, N—Necrosis, —Symptomless.

2.2 cDNA 合成及 *HC-Pro* 基因的扩增

为得到 *HC-Pro* 基因的全长序列,设计引物时向 5' 和 3' 端各延伸了约 100bp。以反转录合成的 cDNA 第一链为模板,扩增得到长约 1700bp 的条带,与预期片段大小相符,阴性对照无特异性条带(图 1)。

2.3 *HC-Pro* 基因的克隆

扩增产物回收后连接到 pEGM-T Easy 载体,连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株,在含 IPTG、X-gal 的氨苄青霉素 (Amp) LB 平板上筛选重组质粒。可能含外源基因的重组质粒的转化细胞形成白色菌落,无插入片段的细胞则形成蓝色菌落。每个平

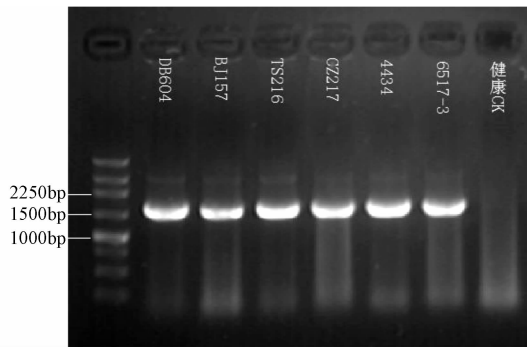


图1 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoreses of RT-PCR

板随机挑取 10 个白色菌落进行培养后,均可以检测到外源目的片段,大小约 1 700 bp。

2.4 HC-Pro 基因的序列分析

HC-Pro 测序结果经分析后发现,6 个 HC-Pro 基因序列全长均为 1371 个核苷酸,共编码 457 个氨基酸(图 2)。HC-Pro 序列存在行使功能的结构域:其中第 291~293 位氨基酸是与病毒移动有关的 CCC 基序,除 DB604 外,其余 5 个分离物第 309~311 位氨基酸均有与蚜传相关的 PTK 基序。但未发现马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 蛋白具有的与蚜虫口针有关的 KITC 基序和与病毒复制相关的 IGN 基序,这一点与已知 SMV 全长的 HC-Pro 氨基酸序列一致。

6 个 SMV 分离物的 HC-Pro 基因高度同源(表 2),其核苷酸序列同源性为 89.2%~99.9%,氨基酸序列同源性为 95.4%~99.8%。457 个氨基酸残基共存在 24 个碱基差异,分散在整条 HC-Pro 序列上。分离物 TS216 与 4434 仅有 1 个氨基酸差异,同源性高达 99.8%,然而二者在大多数鉴别寄主上的症状反应并不相同;TS216 与 CZ217 存在 2 个氨基酸差异,同源性为 99.1%,二者在大多数鉴别寄主上的症状反应相同;DB604 与 TS216 存在 20 个氨基酸的差异,同源性仅为 95.6%,然而二者在除 Buffa-lo 和 8101 外的其它鉴别寄主上的反应均一致。6517-3 与 BJ157 在半数以上鉴别寄主上症状反应相同,二者亦仅有 1 个氨基酸差异,同源性亦为 99.8%。以上结果表明,SMV 分离物 HC-Pro 基因的同源性与 SMV 在鉴别寄主上的致病性反应没有明显关系。

分离物 TS216 对 CZ217 在跃进 4 号上的交叉保护率高达 68%^[5],二者的氨基酸序列同源性高达 99.1%,一定程度上说明了亲缘关系近的 SMV 分离物间的交叉保护作用较强,而肖火根^[1]也认为株系间交叉保护作用的程度与株系间的亲缘关系呈正相关。

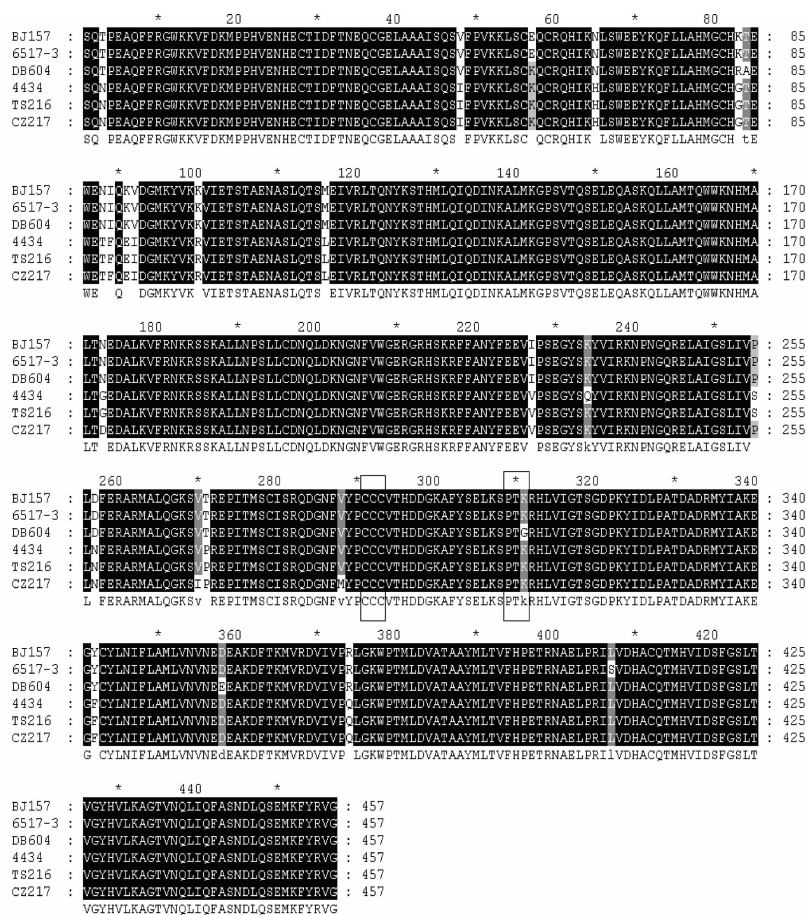


图2 6 个 SMV 分离物的 HC-Pro 基因编码氨基酸序列

Fig. 2 HC-Pro Amino acid sequences of six SMV isolates

表2 6个SMV分离物HC-Pro基因核苷酸及氨基酸同源性

Table 2 Homology of HC-Pro gene of six SMV isolates/%

| SMV 分离物 SMV isolate | BJ157 | 4434 | TS216 | CZ217 | 6517-3 |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| DB604 | 97.1/98.9 | 89.2/95.4 | 89.5/95.6 | 89.7/95.4 | 97.0/98.7 |
| BJ157 | | 89.4/95.8 | 89.5/96.1 | 90.1/95.8 | 99.8/99.8 |
| 4434 | | | 99.9/99.8 | 96.6/98.9 | 89.5/95.6 |
| TS216 | | | | 96.6/99.1 | 89.6/95.8 |
| CZ217 | | | | | 90.2/95.6 |

核苷酸同源性/氨基酸同源性。

Homology of nucleotide acid /Homology of amino acid.

参试的6个SMV分离物和其它SMV株系以及同属其它病毒之间HC-Pro基因的序列(表3)比较表明,参试SMV分离物与SMV其它株系之间HC-Pro基因的序列同源性较高,核苷酸同源性为78.6%~99.6%,氨基酸同源性为89.7%~99.6%;SMV与同属其它病毒包括葱黄斑病毒

(SYSV)、阿尔及利亚西瓜花叶病毒(AWMV)、芜青花叶病毒(TuMV)、马铃薯Y病毒(PVY)、烟草蚀纹病毒(TEV)、花生斑驳病毒(PMV)的核苷酸同源性较低,为49.1%~59.5%,氨基酸序列同源性为42.2%~57.8%。

表3 SMV分离物与其它病毒HC-Pro基因核苷酸及氨基酸同源性

Table 3 Homology of HC-Pro gene of SMV isolates and other potyviruses/%

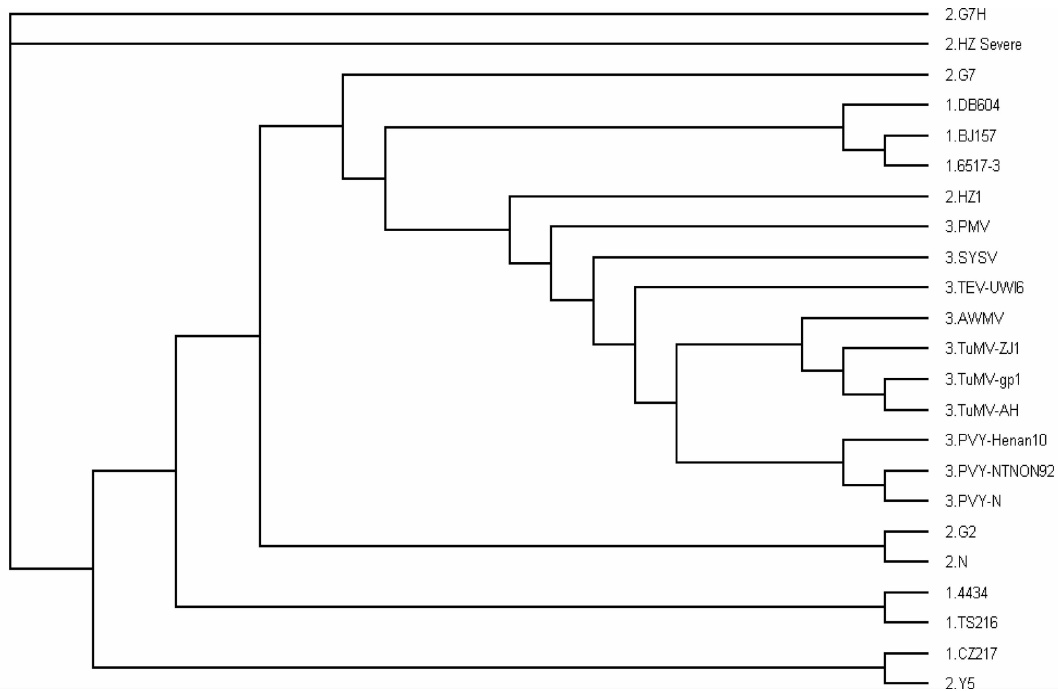
| 病毒株系 Virus strain | Genbank 登录号 Genbank accession | SMV 分离物 SMV isolates | | | | | |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | number | DB604 | BJ157 | 4434 | TS216 | CZ217 | 6517-3 |
| SMV-G2 ^{*1} | S42280 | 90.6/96.3 ^{*2} | 90.9/96.3 | 95.6/98.0 | 95.7/98.2 | 96.6/98.2 | 90.9/96.1 |
| SMV-G7 | AF241739 | 89.6/95.0 | 89.8/95.4 | 94.3/96.9 | 94.3/97.2 | 95.6/97.2 | 90.0/95.2 |
| SMV-G7H | AY294045 | 89.6/95.6 | 89.8/96.1 | 96.9/99.1 | 96.9/99.3 | 98.4/99.3 | 89.9/95.8 |
| SMV-HZ1 | AJ628750 | 79.2/89.9 | 79.9/90.4 | 78.7/89.5 | 78.7/89.7 | 78.6/89.7 | 79.8/90.2 |
| SMV-HZ(S) | AJ312439 | 89.5/95.4 | 89.7/95.8 | 96.7/98.9 | 96.8/99.1 | 98.8/99.1 | 89.8/95.6 |
| SMV-N | D00507 | 89.9/95.6 | 90.4/95.8 | 95.7/97.6 | 95.8/97.8 | 96.8/97.8 | 90.5/95.6 |
| SMV-Y5 | AJ310200 | 89.6/95.0 | 90.0/95.4 | 96.5/98.5 | 96.6/98.7 | 99.6/99.6 | 90.1/95.2 |
| SYSV | AM267479 | 51.3/42.9 | 51.6/43.1 | 51.2/43.3 | 51.2/43.3 | 51.3/43.1 | 51.6/42.9 |
| AWMV | NC_010736 | 53.1/45.7 | 53.5/46.0 | 53.5/46.2 | 53.5/46.2 | 53.0/45.5 | 53.5/45.7 |
| TuMV-gp1 | NC_002509 | 51.1/45.5 | 50.9/45.7 | 53.1/46.0 | 53.0/45.7 | 51.4/45.5 | 50.9/45.5 |
| TuMV-ZJ1 | AJ831821 | 51.1/45.3 | 51.6/45.5 | 54.3/45.7 | 54.2/45.5 | 53.2/45.7 | 51.6/45.3 |
| TuMV-AH | AJ831820 | 50.0/45.3 | 49.7/45.5 | 51.6/45.7 | 51.6/45.5 | 50.4/45.3 | 49.7/45.3 |
| PVY-Henan10 | AM236853 | 50.5/42.7 | 51.0/42.7 | 50.0/42.2 | 50.0/42.2 | 50.5/42.2 | 50.8/42.5 |
| PVY-NTNON92 | AB331519 | 49.8/42.5 | 49.8/42.5 | 49.2/42.2 | 49.2/42.2 | 49.1/42.2 | 49.7/42.2 |
| PVY-N | AM905427 | 50.3/42.8 | 50.7/42.9 | 50.4/42.7 | 50.4/42.7 | 50.4/42.7 | 50.5/42.7 |
| TEV-UWI6 | EU418794 | 52.2/45.3 | 51.5/44.6 | 53.0/45.3 | 53.0/45.5 | 52.7/45.3 | 51.5/44.9 |
| PMV | DQ868540 | 59.5/57.3 | 59.4/57.8 | 57.4/57.1 | 57.5/57.3 | 57.8/57.5 | 59.4/57.5 |

1. 病毒种名-株系;2. 核苷酸同源性/氨基酸同源性。

1. Virus specific name-Stain;2. Homology of nucleotide acid /Homology of amino acid.

参试6个SMV分离物及本属其它病毒23个株系的HC-Pro基因的系统进化树见图3。在23个马铃薯Y病毒属株系中,3个TuMV毒株的HC-Pro基因为1374个碱基,PMV和SYSV为1377个碱基,PVY 3个毒株N、NTNON92、Henan10分别为1395、

1365和1368个碱基,其它毒株均为1371个碱基。从23个序列的同源性矩阵可以看出,SMV之间亲缘关系较近;SMV与PMV亲缘关系相对较近,与TuMV和PVY亲缘关系较远。同种病毒的HC-Pro同源性较高,而不同种病毒的同源性则相差较大。



标号 1 为该试验参试 SMV 分离物;标号 2 为其它已报道 SMV 株系;标号 3 为本属其它病毒。

1-six SMV isolates in present study; 2-other SMV strains reported; 3-other potyvirus reported.

图 3 SMV 与 Potyvirus 其它病毒的 *HC-Pro* 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *HC-Pro* of SMV isolates and other Potyvirus reported

3 讨论

3.1 *HC-Pro* 蛋白的同源性及其病毒株系划分

目前对植物病毒的株系划分大多根据其在鉴别寄主上的致病性反应来进行,而鉴别寄主上的症状表现实际上是寄主与病毒间相互作用的结果。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。目前有多位学者研究了 SMV 及马铃薯 Y 病毒属多个病毒基因所编码的蛋白质与致病性的关系。Jayaram 等报道,SMV 美国株系间基因组序列变异较大的 P1 和 P3 蛋白,很可能与致病性差异相关^[6]。P1 蛋白是 SMV 株系变异最大的区域,除去 P1 蛋白差异,SMV 的 Y5、G2 和 G7 这 3 个株系的致病性差异最有可能与 CI 蛋白 C-末端和 P3 蛋白 C-末端区域有关^[7]。王延伟认为,CI 蛋白(风轮状内含体蛋白)可能参与病毒 RNA 的复制,P1 蛋白与病毒粒子在寄主细胞之间的转运有关,这些蛋白或更多的蛋白可能共同决定了 SMV 的致病性^[8]。TUMV 基因组 P1/*HC-Pro* 编码区,特别是 *HC-Pro* 5' 端编码区参与症状的表达^[9-10],P3 编码区也参与症状表现^[11]。该研究的结果表明,同种病毒的 *HC-Pro* 基因同源性较高,不同种病毒间相差较大。部分根据寄主反应所划分的不同株系其 *HC-Pro* 基因同源性却很高。因此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。

3.2 SMV 防治的启示

Jari^[12]认为 *HC-Pro* 蛋白能够影响马铃薯 Y 病毒属株系间的交叉保护作用 and 病毒积累,但 SMV 的 *HC-Pro* 基因序列与交叉保护作用之间有何联系却未见研究报道。该研究对 SMV 的 *HC-Pro* 基因与病毒相关性状进行了初步研究,其中 *HC-Pro* 蛋白保守的功能基序与已有的研究一致^[13,14];亲缘关系近的 SMV 分离物间的交叉保护作用较强,这与肖火根^[15]株系间交叉保护作用的程度与株系间的亲缘关系呈正相关的研究结果一致。目前防治 SMV 的有效手段是培育抗病品种、农药防治介体蚜虫等^[16]。培育抗病品种虽有效但周期长,农药杀虫成本高且污染环境,而基因工程可以提供广谱抗性,可能是未来发展方向。弱毒株系的交叉保护作用已成功用于多种植物病毒病害的生物防治,但在 SMV 研究甚少,随着分子生物学的发展,基于交叉保护的转基因保护策略将会受到越来越多的重视。

参考文献

- [1] 肖火根,周国辉,范怀忠. 病毒在植物体内的运转[J]. 病毒学报,2001,17(3):282-287. (Xiao H G, Zhou G H, Fan H Z. Virus transfer in plant in vivo[J]. Chinese Journal of Virology, 2001,17(3):282-287.)

- [2] Malysenko S I, Kondakova O A, NaZarova J V, et al. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins [J]. Journal of general virology, 1993, 74: 1149-1156.
- [3] Rojas M R, Murilo Zerhini F, Allison R F. Capsid protein and helpercomponent-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins [J]. Virology, 1997, 237: 283-295.
- [4] Beachy R N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8: 215-220.
- [5] 刘宁, 马莹, 王大刚, 等. 大豆花叶病毒株系间的交叉保护作用研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(2): 213-218. (Liu N, Ma Y, Wang D G, et al. Research on cross-protection between different isolates[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2009, 31(2): 213-218.)
- [6] Jayaram C H, Hill J H, Miller W A. Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the Rsv resistance gene [J]. Journal of General Virology, 1992, 73: 2067-2077.
- [7] 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, 18(3): 271-274. (Chen J, Li H Y, Shang Y F, et al. Biological characterization and sequence analysis of soybean mosaic virus of Chinese Huanghuai 5 strain [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 18(3): 271-274.)
- [8] 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.)
- [9] Klein P G, Klein R R, Rodriguez-Cerezo, et al. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome [J]. Virology, 1994, 204: 759-769.
- [10] Atreya C D, Atreya P L, Thornbury D W, et al. Site-directed mutation in potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity virus accumulation and symptom express in infected tobacco plant [J]. Virology, 1992, 191: 106-111.
- [11] Glasa M, Marie-Jeanne V, Moury B, et al. Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of Plum potyvirus [J]. Archives of Virology, 2002, 147: 563-575.
- [12] Valkonen J P T, Rajamäki M L, Kekarainen T. Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a potyvirus [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15: 683-692.
- [13] 王睿, 吴云峰, 郝兴安, 等. 马铃薯 Y 病毒 N 株 HC-pro 基因的序列分析与表达 [J]. 中国病毒学, 2005, 20(3): 320-322. (Wang R, Wu Y F, Hao X A, et al. Sequence analysis of the HC-pro gene of potato Virus Y N strain and its expression in *E. coli* [J]. Virologica Sinica, 2005, 20(3): 320-322.)
- [14] 郭明, 鲁瑞芳, 王海云. 马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 基因的克隆、序列分析以及原核表达 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 249-252. (Guo M, Lu R F, Wang H Y. Cloning and sequencing of helper component proteinase gene of potato virus Y and its expression in *Escherichia coli* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2000, 8(3): 249-252.)
- [15] 肖火根, 范怀忠. 交互保护作用及其在植物病毒病防治上的应用 [J]. 中国病毒学, 1994, 9(1): 1-6. (Xiao H G, Fan H Z. Cross-protection and Its Use to the Control of Plant Virus Disease [J]. Virologica Sinica, 1994, 9(1): 1-6.)
- [16] 崔伯法, 王洪祥, 翁法令. 交叉保护在植物病毒病害防治中作用的概述 [J]. 中国生物防治, 1998, 14(2): 75-77. (Cui B F, Wang H X, Weng F L. A reveal on cross-protection in Control of Plant Virus Disease [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1998, 14(2): 75-77.)

欢迎订阅 2011 年《北方园艺》

《北方园艺》是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、黑龙江省优秀科技期刊。本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。设有试验研究、研究简报、专题综述、设施园艺、实用技术、园林花卉、贮藏与加工、食用菌、中草药、经验交流、农业经纬等栏目。内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新成果、新技术、新品种、新经验。竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生, 各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。

国内外公开发行, 半月刊, 每月 15 日、30 日出版, 邮发代号 14-150, 每册定价 6.00 元, 全年 144.00 元, 全国各地邮局均可订阅, 或直接向编辑部汇款订阅, 订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数, 收件人姓名及详细地址、邮编。

地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

邮编: 150086

电话: 0451-86674276

E-mail: bfybjb@163.com