

侵染人参果的马铃薯 M 病毒基因组全序列分析

郑红英 陈 炯 陈剑平*

(浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所 浙江省植物病毒重点开放实验室 杭州 310021)

摘 要 测定了侵染人参果的马铃薯 M 病毒(PVM-Ch)基因组全序列。线状、单链正义 RNA 全长 8526bp,含 6 个开读框(ORF),具麝香石竹潜隐病毒属(*Genus Carlavirus*)典型结构特征。序列比较表明它与其他 PVM 分离物各基因核苷酸和编码蛋白氨基酸序列同源性分别为 62.5%~97.2%和 60.9%~97.4%,其中 CP 基因最保守,而 TGB3 基因变异最大。系统进化树分析表明美国爱达荷州马铃薯分离物(PVM-Id)(AF023877)为 PVM 的一个远缘株系,而其他 4 个 PVM 分离物的成簇在外壳蛋白(Coat protein, CP)和核酸结合蛋白(Nucleic acid binding protein, NABP)区域略有差异。这是 PVM 在人参果上侵染的首次报道。

关键词: 马铃薯 M 病毒,基因组结构,系统进化树分析,人参果

中图分类号: S432.41 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0336-06

人参果(*Solanum muricatum*)原产于哥伦比亚和智利安第斯山温带地区、秘鲁、厄瓜多尔等国家,为茄科、半木质化多年生草本植物。目前世界上新西兰和澳大利亚把它作为热带水果进行商品生产,畅销日本、欧美等国。由于其营养价值高,经济效益好,近年来我国对该植物的引种较为频繁,栽种面积日趋扩大。

近年来浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所引进的人参果组培植株普遍发生病毒病害,典型症状为小叶、皱缩、扭曲和斑驳,植株严重矮化,严重影响生长。电镜观察发现病汁液存在许多线状病毒粒子,通过科属特异性简并引物鉴定,证明该病毒为香石竹潜隐病毒属(*Genus Carlavirus*)确定成员马铃薯 M 病毒(Potato virus M, PVM),并完成了其基因组全序列测定和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

2001 年 10 月在浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所引种温室中采集具有典型皱缩症状的人参果病叶, -80℃ 储存备用。

1.2 病毒提纯、病毒 RNA 抽提和第一条 cDNA 链合成

根据文献 [1] 描述的方法提纯病毒、抽提病毒 RNA。起始引物为 M4-T [5'-GTTTTTCCAGTCACGAC(T)₁₅-3'],以 M-MLV 逆转录酶(Life technologies 公司)逆转录合成病毒 RNA

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(ZA0207);国家自然科学基金项目(30200008);国家杰出青年基金(30225031)浙江省十五重大项目(011102181)

* 通讯作者。Tel 86-571-86404003; Fax 86-571-86400481; E-mail: jphen 2001@hznc.com

作者简介: 郑红英(1977-), 硕士, 助理研究员, 主要从事植物病毒分子鉴定研究。

收稿日期: 2002-09-16, 修回日期: 2002-12-03

第一条 cDNA 链,方法参照产品说明。

1.3 PCR 扩增

PCR 采用 Expand Long Template PCR system(Roche 公司)引物根据序列(EMBL 序列号 D14449)设计,反应体系参照产品说明。反应程序为 94℃ 变性 2min 后,经 30 个循环扩增(94℃ 30s, 50℃ 30s, 68℃ 2min)后经 68℃ 延伸反应 10min 以确保获得全长产物。病毒 RNA 5'-端序列的扩增按文献[2]描述的 RACE 方法进行扩增。

1.4 克隆、测序和分析

PCR 产物经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离,切下预期大小条带,用 QIAquick 胶纯化试剂盒(Qiagen 公司)回收,纯化产物直接插入 pGEM-T 载体(Promega 公司),方法参照产品说明。测序由上海博亚公司完成。序列分析采用 GCG 软件。

2 结果与讨论

2.1 PVM 人参果分离物基因组结构特征

线状、单链正义 RNA 全长 8526bp(不包括 polyA 尾),含 6 个开读框(ORF),基因组结构和文献[3]报道的相似(图 1)。5'-和 3'-UTR 长度分别为 76bp 和 52bp。

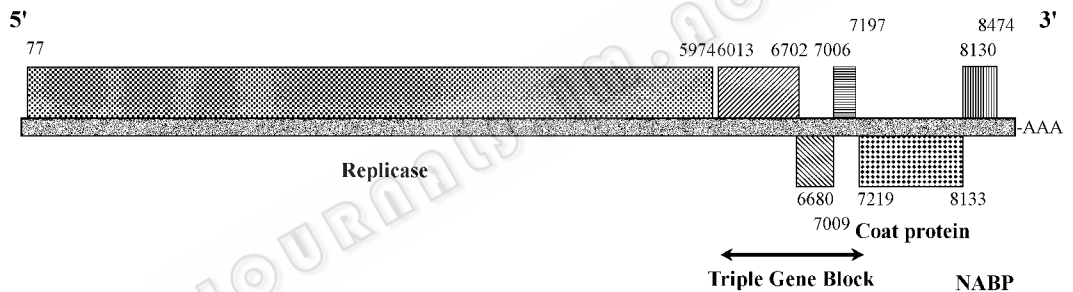


图 1 马铃薯 M 病毒人参果分离物基因组结构示意图

Fig. 1 Genome organization of Potato virus M on *Solanum muricatum*

大多数植物 RNA 病毒都编码两个和基因组 RNA 复制相关的蛋白质:聚合酶和解旋酶,PVM ORF1 编码的复制酶蛋白由 1965 个氨基酸组成,分子量 222.6kD,计算机分析表明该蛋白第 1808 ~ 1843 位为 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶(RdRp)活性位点保守基序 SGX₃TX₃NTX_{18~37}GDD,第 1165 ~ 1172 位为解旋酶活性相关的 NTP 结合基序 GXXGXGKS,该蛋白可能通过自催化裂解成功能性的蛋白而起作用^[4]。ORF2、3 和 4 合称为三联基因模块(Triple Gene Block, TGB),ORF2 和 3、ORF3 和 4 之间分别存在 22 个和 4 个核苷酸序列的重叠。ORF2 编码一个由 229 氨基酸组成的 25.3kD 的 TGB1 蛋白,富含亮氨酸(约 11%),第 28 ~ 35 位存在一个 NTP 结合基序 CVPGAGKS,ORF3 编码一个由 109 个氨基酸组成的 11.8kD 的 TGB2 蛋白,二级结构预测表明能形成两个明显的跨膜结构(氨基酸序列第 12 ~ 34 位和第 75 ~ 92 位),N-和 C-末端暴露在细胞膜内侧;ORF4 编码一个由 63 个氨基酸组成的 6.7kD 的 TGB3 蛋白,氨基酸序列第 2 ~ 19 位也存在一个典型的跨膜 α -螺旋,推测形成一个 TM 结构,C-末端暴露在细胞膜内。类似跨膜结构也存在干马铃薯 X 病毒属

(Genus *Potexvirus*) 葱 X 病毒属 (Genus *Allexivirus*) 和 *Carlavirus* 属其他成员相应编码蛋白中 (结果未显示)。相关病毒研究表明, TGB1 蛋白 N-端区域具有 NTP 水解和 RNA 结合等功能, 而 C-末端区域和蛋白间的特异性相互作用有关^[5]。TGB2 蛋白很可能起调控胞间连丝口径的作用, TGB3 蛋白能结合到植物细胞膜上, 并协助 TGB2 蛋白在膜上的定位功能^[6]。ORF5 编码一个由 304 个氨基酸组成的 33.9kD 的 CP, 有报道表明 *Potexvirus* 属成员 CP C-末端区域和运动蛋白存在相互作用^[5,7], 可能也参与胞间运动。ORF6 与 ORF5 存在 4 个核苷酸序列的重叠, 编码一个由 114 个氨基酸组成的 12.9kD 核酸结合蛋白 (NABP), 可能与病毒 RNA 复制的调控有关, 起稳定蛋白-RNA 复合体的作用^[8]。

2.2 与其他相关病毒分离物的同源性比较和系统进化分析

BLAST 搜索分析表明, PVM 与乌头潜隐病毒 (Aconitum latent virus, AcLV) 和蛇麻草潜隐病毒 (Hop latent virus, HLV) 具有较高的序列同源性。比较已登录 EMBL/DDBJ/GenBank 数据库的这些病毒序列发现, 侵染人参果的 PVM (PVM-Ch) 与俄国侵染马铃薯的 PVM 野生型分离物 (PVM-Ru) 同源性较高, 全序列核苷酸同源性为 92.4%, 各编码蛋白氨基酸同源性为 85.9% ~ 96.4%, CP 基因最保守, 而 TGB3 基因变异最大。德国马铃薯分离物 (PVM-Ge) 和意大利番茄分离物 (PVM-It) 也和以上两个分离物相似, 但美国爱达荷州侵染马铃薯的 PVM 分离物 (PVM-Id) 与其他 PVM 分离物差异较大, 其 CP 基因区域的差异主要发生在第 3 密码子上, 因此它与其他分离物 CP 氨基酸序列同源性仍高达 87.2% ~ 87.9%。*Carlavirus* 属成员中最相似的两个病毒 PVM 和 AcLV 之间, CP 氨基酸序列同源性 < 73.6% (表 1)。

表 1 马铃薯 M 病毒和其他相似病毒分离物基因组和各基因核苷酸 (上右) 和编码蛋白氨基酸 (下左, 斜体) 同源性比较

Table 1 Percentage of nucleotide (up, right) and amino acid (down, left, italic) identities of Potato virus M and other similar carlaviruses

	PVM-Ch	PVM-Ru	PVM-Id	PVM-Ge	PVM-It	AcLV	HLV
	AJ437481	D14449	AF023877	X57440	X85114	AB051848	AB032469
Complete sequence							
PVM-Ch	*	92.4				57.5	58.0
PVM-Ru		*				57.0	57.7
AcLV						*	58.3
Replicase							
PVM-Ch	*	91.6				56.4	57.4
PVM-Ru	93.2	*				55.7	57.0
AcLV	54.1	53.4				*	57.4
HLV	55.1	54.2				56.4	*
TGB1							
PVM-Ch	*	93.9				60.9	61.3
PVM-Ru	95.7	*				60.4	61.6

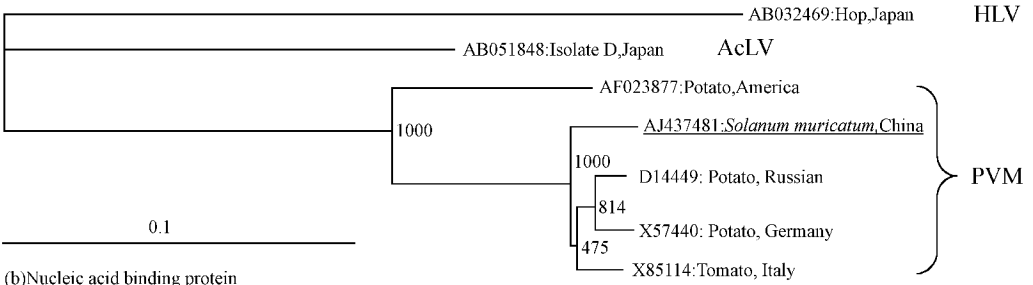
续表 1

	PVM-Ch AJ437481	PVM-Ru D14449	PVM-Id AF023877	PVM-Ge X57440	PVM-It X85114	AcLV AB051848	HLV AB032469
AcLV	59.1	59.1				*	61.0
HLV	65.5	67.2				61.3	*
TGB2							
PVM-Ch	*	93.0	68.8			57.0	52.0
PVM-Ru	94.5	*	70.3			57.6	51.7
PVM-Id	77.3	77.3	*			56.1	55.7
AcLV	56.4	56.4	54.5			*	59.0
HLV	54.2	53.3	55.0			61.5	*
TGB3							
PVM-Ch	*	91.1	62.5			52.7	49.4
PVM-Ru	85.9	*	62.5			53.2	50.6
PVM-Id	60.9	62.5	*			51.1	53.3
AcLV	41.9	40.3	45.8			*	48.1
HLV	45.0	41.7	36.7			38.3	*
CP							
PVM-Ch	*	94.2	75.4	93.4	93.7	63.9	61.6
PVM-Ru	96.4	*	75.6	98.0	97.4	66.1	62.1
PVM-Id	87.2	87.9	*	75.6	75.6	65.1	63.2
PVM-Ge	96.4	98.0	87.9	*	97.4	65.9	62.1
PVM-It	96.7	97.4	87.9	97.0	*	66.2	61.8
AcLV	73.6	72.9	70.2	72.6	72.2	*	64.0
HLV	63.8	63.8	64.4	63.5	63.8	68.4	*
NABP							
PVM-Ch	*	95.1	68.8	96.0	95.4	53.1	56.5
PVM-Ru	91.7	*	68.1	97.2	96.0	51.9	55.9
PVM-Id	71.0	69.9	*	69.5	69.5	50.9	53.6
PVM-Ge	94.5	95.4	71.0	*	97.2	53.8	55.9
PVM-It	92.7	91.7	71.0	96.3	*	52.8	55.9
AcLV	49.1	50.0	46.2	50.9	50.0	*	54.3
HLV	54.3	55.2	46.7	55.2	54.3	59.0	*

系统进化树分析清楚地显示 ,PVM-Id 与其他 PVM 分离物进化相关性较远 ,为一个远缘株系 ,而 PVM-Ch、PVM-It、PVM-Ru 和 PVM-Ge 4 个分离物的成簇在 CP 和 NABP 区域略有差异 (图 2) ,HLV(AB032469)为根植序列 ,分叉上数值表示 1000 次成簇中该簇出现的次数 ,标尺长度表示每一位点发生 0.1 次置换。已报道的 PVM 分离物序列信息很少 ,但就已有资料来看 ,很难将序列差异与寄主植物或者地理分布差异联系起来。

从已有的研究来看 ,PVM 寄主范围狭窄 ,寄主植物主要为茄科的马铃薯和番茄等 ,而侵染人参果是首次报道。 *Carlavirus* 属成员侵染植株一般不显症状 ,但 PVM 侵染马铃薯能引起明显症状 ,它和该属另一个成员马铃薯 S 病毒(Potato virus S , PVS)复合侵染时 ,决定寄主症状 ,但两者互作机制尚有待进一步研究。

(a) Coat protein



(b) Nucleic acid binding protein

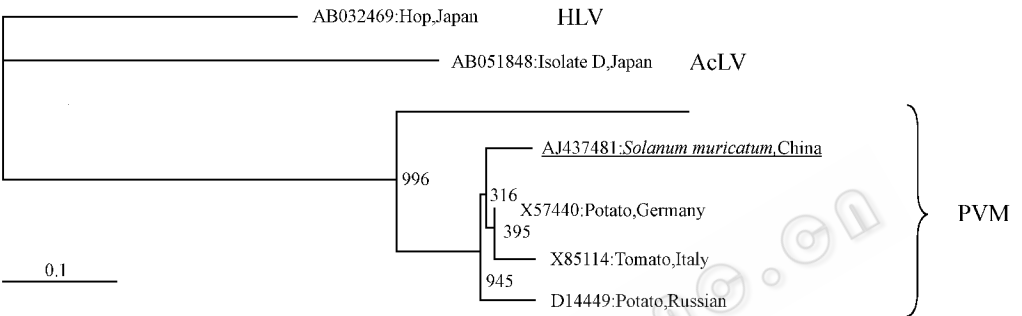


图 2 马铃薯 M 病毒及相近病毒分离物外壳蛋白和核酸结合蛋白氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis on amino acid sequences of coat protein and nucleic acid binding protein of Potato virus M and similar carlaviruses

Rooted with HLV (AB032469). The values at the forks indicate the number of times out of 1000 trees that this grouping occurred after bootstrapping the data; Bars show distances as substitutions per base.

参 考 文 献

- [1] Foster G D. Carlavirus isolation and RNA extraction. *Methods Mol Biol*, 1998, **81**: 145 ~ 150.
- [2] Chen J, Chen J P, Chen J S, *et al.* Molecular characterisation of an isolate of *Dasheen mosaic virus* from *Zantedeschia aethiopica* in China and comparisons in the genus *Potyvirus*. *Arch Virol*, 2001, **146**(9): 1821 ~ 1829.
- [3] Zavriev S K, Kanyuka K V, Levay K E. The genome organization of potato virus M RNA. *J Gen Virol*, 1991, **72**(1): 9 ~ 14.
- [4] Lawrence D M, Rozanov M N, Hillman B I. Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase. *Virology*, 1995, **207**(1): 127 ~ 135.
- [5] Lough T J, Netzler N E, Emerson S J, *et al.* Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol Plant-Microbe Inter*, 2000, **13**: 962 ~ 974.
- [6] Morozov S Y, Miroshnichenko N A, Solovyev A G, *et al.* *In vitro* membrane binding of the translation products of the carlavirus 7-kDa protein genes. *Virology*, 1991, **183**(2): 782 ~ 785.
- [7] Fedorkin O, Solovyev A, Yelina N, *et al.* Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J Gen Virol*, 2001, **82**(2): 449 ~ 458.
- [8] Vilar M, Esteve V, Pallas V, *et al.* Structural properties of carnation mottle virus p7 movement protein and its RNA-binding domain. *J Biol Chem*, 2001, **276**(21): 18122 ~ 18129.

Complete Sequence Analysis on Potato Virus M Infecting *Solanum muricatum*

Zheng Hongying Chen Jiong Chen Jianping*

(Department of Virology and Biotechnology , Zhejiang Academy of Agricultural Sciences , Hangzhou 310021 , China)

Abstract : The complete sequence of Potato virus M from *Solanum muricatum* was determined. The linear , single-strand and positive sense genomic RNA was 8526 nucleotides long and six open reading frames were identified. The genome organization was typical feature of genus *Carlavirus*. Sequence analysis showed that PVM isolates shared 62.5% ~ 97.2% nucleotide and 60.9% ~ 97.4% amino acid identities. The coat protein gene was most conserved and TGB3 gene was greatly variable. Phylogenetic tree analysis suggested that the Idaho potato isolate(PVM-Id) was a distant strain , and other 4 isolates were grouped discriminatively based on CP and NABP amino acid sequences respectively. This is the first report of PVM from *Solanum muricatum*.

Key words : Potato virus M , Genome organization , Phylogenetic tree analysis , *Solanum muricatum*.

Foundation item : Key and Major Project the Zhejiang Provincial Natural Science Fund(ZA0207) ; Chinese National Natural Science Fund(30200008) ; The 10th Five Years Research Programs of Zhejiang Province(011102181)

* Corresponding author. Tel 86-571-86404003 ; Fax 86-571-86400481 ; E-mail jipchen 2001@hznc. com

Received date 09-16-2002

欢迎订阅《微生物学报》

《微生物学报》(双月刊)创刊于 1953 年,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学核心期刊。主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。

2003 年本刊全新改版,更换了彩色封面,由原来的 128 页扩增到 144 页,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局或直接与本刊编辑部联系购买,每册定价 28 元,全年 168 元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,每册定价 20 元,款到即免费寄上(请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)。

邮购地址:100080 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

Tel (010) 62630422 ; Fax (010) 62554303 ; E-mail :actamicro@sun. im. ac. cn