

百合斑驳病毒浙江分离物的基因组 3'端序列分析

刘文洪^{1,2} 洪 健^{2*} 陈集双¹ 王 冲¹ 叶美琴³

(¹ 浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

(² 浙江大学分析测试中心 杭州 310029)

(³ 浙江丽水市农业局 丽水 323000)

摘 要 经 RT-PCR 扩增从浙江丽水的亚洲百合 [*Lilium cvs.* (Asiatic Hybrids)] 获得 2 个 *Potyvirus* 病毒分离物 G 和 X 的 3'-端 cDNA 片段, 序列分析表明均为百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV), 将 12 个来源于不同地区百合与郁金香上的 *Potyvirus* 分离物进行序列同源性比较和系统进化树分析, 结果表明 G、X、ML61、1229、2b、MD、HZ、J 这 8 个分离物的 CP 核苷酸序列同源性达 85.9% ~ 100%, 在进化树中聚集成簇, 归为 LMoV 2b2、TM 和 TBV1 3 个分离物同源性达 91.2% ~ 99.3%, 在进化树中也单独成簇, 归为郁金香碎色病毒 (*Tulip breaking virus*, TBV) 2b3 与其它 11 个分离物同源性在 74.4% ~ 79.8% 之间, 为伦布兰特郁金香碎色病毒 (*Rembrandt tulip breaking virus*, ReTBV)。NIB 基因序列和 3'-UTR 序列分析也表明 G、X、ML61、1229、J、HZ 这 6 个分离物之间亲缘关系较近, 属于 LMoV, 而 TM 与它们的亲缘关系很远, 属于 TBV。LMoV 分离物存在着两个群体, G 和 X 分别处在第 1 群体和第 2 群体中, 不表现地域相关性及寄主相关性。根据研究结果, 将迄今世界各地侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* 分离物归为 LMoV、TBV 和 ReTBV 3 个种。

关键词 百合斑驳病毒, 郁金香碎色病毒, 伦布兰特郁金香碎色病毒, 亚洲百合, 序列分析

中图分类号: Q785; S436.421 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)03-0386-04

百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV) 是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的重要病毒之一, 其分布范围较广, 在意大利 (Bertaccini, 1982)、日本 (Hagita, 1994)、以色列 (Cohen, 1996)、荷兰 (Asjes, 2002)、中国台湾 (Chang, 2002) 等地均有报道^[1~5]。该病毒是危害百合属作物的重要病毒病原。但文献中报道引起百合与郁金香花叶及碎色的 *Potyvirus* 病毒有多种, 在分类和命名上存在着一定的混淆。在我国, 有关侵染百合的病毒病原研究很少, 仅陈炯等^[6]对侵染龙牙百合和欧洲百合的 LMoV 作过研究报道。2003 年我们在浙江丽水的亚洲百合上分离到两个 *Potyvirus* 病毒分离物, 通过病毒基因组 3'端序列分子克隆和测序分析, 结合病毒粒子和细胞内含体的电镜观察, 将两分离物鉴定为 LMoV。本文进一步对两分离物的核内含体复制酶 (NIB) 基因部分序列、外壳蛋白 (CP) 基因序列和 3'-端非编码区序列作系统进化分析, 并根据基因序列同源性比较和系统进化树分析结果, 将国内外不同地区百合与郁金香上的 12 个 *Potyvirus* 分离物进行了归类, 确定其分类和分化特征。现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒分离物

病毒分离物来源于浙江丽水百合基地田间栽培的百合, 分离物 G 和 X 分别来自商品品种名为“哥伦比亚”和“新中

心”的自然感病亚洲百合 [*Lilium cvs.* (Asiatic Hybrids)] 样品保存于 -80℃ 冰箱中。

1.2 引物设计

根据文献中已报道的侵染百合的 *Potyvirus* 成员, 尤其是 LMoV 基因组序列设计 5'通用引物 P, 5'端引物 LMoV-F 和 3'端引物 M13 (OligodT + Adaptor), 引物序列为 P: 5'-GGX-AAAYAGYGGXCAZCC-3' (X = A, T, C or G; Y = T or C; Z = A or G); LMoV-F: 5'-TCGCATGCTCCCGCCGCC-3'; M13 (OligodT + Adaptor): 5'-GTTTCCAGTCACGAC-(T)₅-3'。

1.3 病毒 RNA 模板制备和 RT-PCR 扩增

取 10mg 鲜叶放入 0.1% DEPC 水处理过的研钵, 加入 200μL PBST 充分研磨, 把上清液转移入 0.5mL 离心管中, 常温下静置 15min, 弃上清, 用 200μL PBST 洗 3 次加入 DEPC 处理水 9.5μL, 80℃ 2min, 迅速置于冰上待用。制备的病毒 RNA 模板在 Oligo(dT) 引导下, 参照 RT-PCR 试剂盒说明, 以引物 M13 反转录合成 cDNA 第一链。取 10μL 合成的 cDNA 为模板, 分别用引物 P/M13 和 LMoV-F/M13 对分离物 G 和 X 进行常规 PCR 扩增。

1.4 克隆和序列测定

扩增产物经 PCR 产物回收试剂盒回收纯化后, 按 Promega T-easy 载体试剂盒说明进行连接反应, 转化到 *E. coli* TG 感受态细胞。在 LB 培养基上 37℃ 培养 16h, 挑取白色菌

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化专项 (02EFN213300269), 浙江省科技厅项目 (2002Z32128)

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971179; E-mail: jhong@zju.edu.cn

作者简介: 刘文洪 (1975 -) 男, 江西省泰和县人, 硕士, 现在浙江中医学院工作, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: lvvh@163.com

收稿日期: 2003-12-09, 修回日期: 2004-02-16

落,碱法提取质粒 DNA,经 PCR 扩增及 *Eco*R I 酶切鉴定重组质粒。在 ABI PRISM 377-96 型 DNA 自动测序仪上进行序列测定。

1.5 序列同源性分析

用 DNASTar 软件分析获得两病毒分离物基因组相应序列,并与已报道侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* 分离物进行核苷酸及氨基酸序列同源性比较。同源性比较和关系树构建所用序列的分离物及其在 GenBank 中的登录号为:1229 (S44147)、2b (S60810)、2b2 (S60804)、2b3 (S60808)、HZ (AJ310203)、J (AB054886)、MD (AB078007)、ML61 (AB053256)、TBV1 (AJ549932)、TM (X63630)。

2 结果

2.1 分离物 G 和 X 基因组 3'端克隆及序列分析

将回收的 1.7kb 和 1.5kb 两个目的片段进行克隆、筛选,获得重组阳性克隆,对阳性克隆分别进行序列测定,得到的分离物 G 克隆片段全长 1692nt,包括 Nib 基因部分序列 (1-630nt)、CP 基因全长序列 (631-1455)、3'-UTR (1456-1681nt) 和 3'端 poly (A) (EMBL/DBJ/GenBank 登录号 AF531458)。对分离物 X 进行 PCR 扩增,获得克隆片段长为 1469nt,包括 Nib 基因部分序列 (1~333nt)、CP 基因全长序列 (334~1161nt)、3'-UTR (1161~1366nt) 和 3'端 Poly (A)。用 DNASTar 软件进行蛋白质序列和结构分析的结果显示:两分离物的 Nib 和 CP 的蛋白裂解位点均为 Q//A,完整的 CP 基因由 828 个核苷酸组成,编码—275 个氨基酸、分子量为 30.9kd 的外壳蛋白。

2.2 侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* CP 基因序列分析

将所获得 2 个分离物的序列 G 和 X 包含的 CP 基因序列与 10 个来源于不同地区百合与郁金香上的 *Potyvirus* 分离物进行序列同源性比较,结果表明,G、X、ML61、1229、2b、MD、HZ、J 这 8 个分离物的 CP 核心区域核苷酸序列具有较高的同源性,为 85.9%~100%。2b2、TM 和 TBV1 3 个分离物的 CP 核苷酸序列同源性高达 91.2%~99.3%。来自伦敦布兰特郁金香上的分离物 2b3 CP 核苷酸序列与其它 11 个分离物同源性较低,在 74.4%~79.8% 之间。将上述 12 个侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* 分离物 CP 核心区域核苷酸序列进行系统进化树分析,结果表明 G、X、ML61、1229、2b、MD、HZ、J 这 8 个分离物在进化树中聚集成簇,2b2、TM 和 TBV1 这 3 个分离物也在进化树中单独成簇,2b3 与其它 11 个分离物的亲缘关系较远,单独归一类 (图 1)。CP 基因氨基酸序列的同源性比较也显示了相似的结果,G、X、ML61、1229、2b、MD、HZ、J 这 8 个分离物间同源性为 87.0%~100%。2b2、TM 和 TBV1 3 个分离物间同源性为 84.5%~98.9%,2b3 与其它 11 个分离物同源性较低,在 71.7%~83.7% 之间。根据序列同源性和系统进化树分析结果可将上述 12 个侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* 分离物划归为 3 个种:G、X、ML61、1229、2b、MD、HZ、J 这 8 个分离物归为 LMoV;2b2、TM 和 TBV1 3 个分离物归为郁金香碎色病毒 (*Tulip breaking virus*, TBV);2b3 归为伦敦布兰特郁金香碎色病毒 (*Rembrandt tulip breaking virus*, ReTBV)。

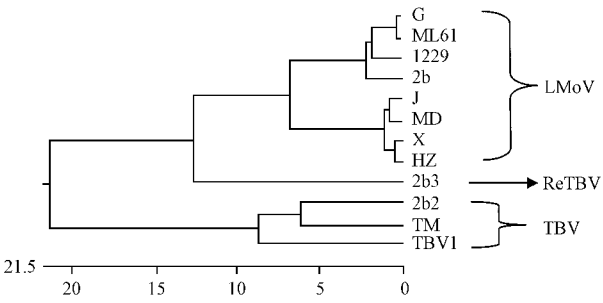


图 1 侵染百合和郁金香的 *Potyvirus* 分离物 CP 核苷酸序列系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of CP sequences for *Potyvirus* isolates obtained from lily and tulip

CP 基因序列同源性和系统进化树的进一步分析表明: LMoV 分离物存在两个种内群体。在第 1 群体中,来自浙江丽水亚洲百合的分离物 G 和日本百合分离物 ML61 亲缘关系很近,同源性为 99.4%。在第 2 群体中,来自日本的两个分离物 J 和 MD 亲缘关系也很近,同源性达 98.4%,形成一定的地域相关性。来自浙江丽水亚洲百合的分离物 X 和来自杭州龙牙百合的分离物 HZ 同源性高达 99.2%,在系统进化树中也表现出更近的亲缘关系。而 G 和 X 间的同源性较低,仅为 86.2%,未表现出明显的地域相关性。

2.3 侵染百合和郁金香的 *Potyvirus* Nib 基因序列分析

将两分离物 G 和 X 的 Nib 基因序列与 5 个来源于不同地区百合和郁金香上的 *Potyvirus* 成员进行同源性分析,结果表明 G、X、ML61、1229、J、HZ 这 6 个分离物间核苷酸序列同源性达 84.7%~100%,G 与 X 间的同源性为 84.7%,TM 与这 6 个分离物的同源性仅为 45.3%~54.9%。Nib 基因核苷酸序列系统进化树分析表明:G、X、ML61、1229、J、HZ 6 个分离物亲缘关系较近,在进化树中聚成一簇,X 与来自杭州龙牙百合的分离物 HZ 在进化树中紧密成簇,亲缘关系很近。而 TM 与这 6 个分离物的亲缘关系很远。Nib 基因氨基酸序列同源性分析显示 G、X、ML61、1229、J、HZ 6 个分离物间同源性为 82.9%~100%,在进化树中聚集成簇,而 TM 与这 6 个分离物的同源性仅为 55.9%~67.3%,亲缘关系很远,应属于不同的种。

2.4 侵染百合和郁金香的 *Potyvirus* 3'-UTR 序列分析

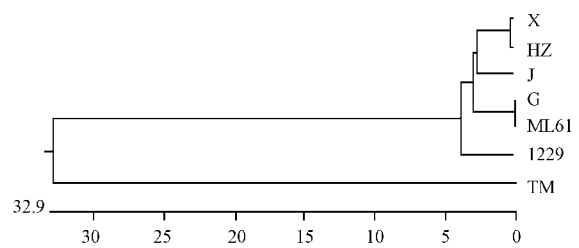


图 2 侵染百合和郁金香的 *Potyvirus* 分离物 3'-UTR 核苷酸序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of 3'-UTR sequences for *Potyvirus* isolates from lily and tulip

将上述 7 个来源于不同地区百合与郁金香上的 *Potyvirus* 成员 3'-UTR 序列进行同源性和系统进化树分析,结果与以上 2 个基因分析的结果相似:G、X、ML61、1229、J、HZ 这 6 个分离物间核苷酸序列同源性达 93.1%~100%,在系统进化树中聚成一簇(图 2),TM 与这 6 个分离物的同源性很低,仅为 39.8%~45.9%,在系统进化树中的亲缘关系很远,显然与这 6 个分离物属不同的种。

3 讨论

LMoV 是引起百合和郁金香花叶和碎色的 *Potyvirus* 属病毒,国外有较多文献报道(Dekker, 1993; Lee, 1998; Bouwen, 2000; Yasuyuki, 2001)^[7-10]。我国近年从各国引种的观赏百合栽培面积日益扩大,但 LMoV 是否普遍存在还不清楚,相关报道很少。我们从不同的亚洲百合品种中获得 *Potyvirus* 分离物 G、X,通过对 CP 基因核苷酸和氨基酸序列、部分 N1b 核苷酸和氨基酸序列以及 3'-UTR 核苷酸序列的分析,证实了 LMoV 在我国百合上的发生。从构建的 CP 基因核苷酸序列系统进化树看,LMoV 分离物存在着两个种内群体,浙江丽水的分离物 G 和 X 分别处在不同的群体中,相互间同源性仅为 86.2%,并不表现明显的地域相关性。这一结果与我国现阶段大量从国外不同地区引种百合种球作为繁殖体有直接关系。分离物 G 与日本百合上的分离物 ML61 表现很近的亲缘关系,X 与来自杭州龙牙百合的分离物 HZ 有近缘关系,这些分离物的寄主品种差异较大,品种的来源不清,因而也难以确定其寄主相关性和适应性遗传的情况。

从浙江丽水得到的两个 LMoV 分离物 G、X 分别源自“哥伦比亚”和“新中心”亚洲百合品种,其上代种球均来自荷兰,第一代发病较轻,而第二代病情严重,病毒究竟是从原产地带入还是在本地感染,尚难下结论。联系到病毒基因组序列上的系统进化关系,不难看出侵染百合的 LMoV 具有相对稳定的遗传背景。陈炯等^[11]将 LMoV 分离物分成欧洲群体和亚洲群体两个群体,但由于百合在世界范围内相互引种很普遍,地域分布的特点已不明显,因此根据其产地探究其病毒属于哪个群体,并不一定有意义。

关于侵染百合和郁金香的 *Potyvirus* 病毒,近年文献报道的有:TBV(S60804)^[12]、郁金香碎色病毒-百合株系(TBV-Lily)(S44147)^[13]、郁金香碎脉病毒(*Tulip band breaking virus*, TBV(S60804)^[14]、芜菁花叶病毒-郁金香碎顶株系(*Turnip mosaic virus*-tulip top breaking strain, TuMV(S60806)^[12]、ReTBV(S60808)^[12]和 LMoV(S60810)^[12]、AJ310203^[6]),此后又报道了一个郁金香花叶病毒部分序列(X63630)^[15],在分类和命名上较为混乱,存在着一定的混淆。我们通过这些分离物 CP 基因序列同源性分析可以发现,来自郁金香上的分离物 1229(S44147)与 LMoV 的 CP 基因氨基酸序列同源性在 89.9%以上,而与 TBV 其它几个分离物的同源性仅在 61.7%~79.3%之间,根据国际病毒分类委员会(ICTV)第七次报告给出的分类标准^[16],不同 *Potyvirus* 属成员 CP 氨基酸序列同源性应小于 85%,其 3'端非编码区核苷酸序列同源性小于 75%,该分

离物应为 LMoV。来自郁金香的 MD(X63630)与 LMoV 的同源性达 87.0%~98.2%,与 LMoV 是同种异名。TM(郁金香花叶病毒(X63630)与两个 TBV 分离物 TBV1 和 2b(X60804、AJ549932)的同源性为 84.5%和 98.9%,虽然与 TBV1 的同源性接近临界值,但该分离物应为 TBV。从本研究对各个分离物基因序列同源性 and 系统进化树的分析结果看,迄今世界各地侵染百合与郁金香的 *Potyvirus* 分离物可归为 LMoV、TBV 和 ReTBV 3 个种。

参考文献

- [1] Bertaccini A, Marani F. Electron microscopy of two viruses and mycoplasma-like organisms in lilies with deformed flowers. *Phytopathologia Mediterranea*, 1982, **21**: 8-14.
- [2] Hagita T, Sasaki J. Occurrence of necrosis of edible lily (*Lilium leichlinii* var. *maximowiczii* Baker) caused by mixed infection of tulip breaking virus (TBV) and unidentified filamentous virus in Hokkaido [Japan]. *Ann Report Society Plant Prot North Japan*, 1994, **45**: 67-71.
- [3] Cohen J, Gera A, Loebenstein G, et al. Virus diseases of lilies in Israel. *Acta Hort*, 1996, **432**: 84-87.
- [4] Asjes C J, Blom B G J, Schadowijk A R, et al. Effect of seasonal detection of lily symptomless virus and *Lily mottle virus* on aphid-borne virus spread in *Lilium* in the Netherlands. *Acta Hort*, 2002, **568**: 201-207.
- [5] Chang C A, Chen C C, Hsu H T, et al. Partial characterization of two potyviruses associated with golden spider lily severe mosaic disease. *Acta Hort*, 2002, **568**: 127-134.
- [6] Jiong Chen, Jianping Chen, Adams M J. Characterisation of some Carla- and potyviruses from bulb crops in china. *Arch virol*, 2002, **147**: 419-428.
- [7] Dekker E L, Derks A F L M, Asjes C J, et al. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower-breaking. *J Gen Virol*, 1993, **74**: 881-887.
- [8] Lee J S, Nou H S, Hong D K, et al. Detection of viral diseases in *Lilium* oriental plants using RT-PCR technique. *RDA J Crop Prot*, 1998, **40**: 50-56.
- [9] Bouwen I, Vlucht R A A. Natural infection of *Alstroemeria brasiliensis* with *Lily mottle virus*. *Plant Disease*, 2000, **84**: 103.
- [10] Yasuyuki Yamaji, Xiaoyun Lu, Satochi Kagiwada, et al. Molecular evidence that a lily-infecting strain of *tulip breaking virus* from Japan is a strain of *Lily mottle virus*. *European J Plant Pathol*, 2001, **107**: 833-837.
- [11] 陈炯,陈剑平. 植物病毒种类分子鉴定. 北京: 科学出版社. 2003, 173-174.
- [12] Dekker E L, Derks A F, Asjes C J, et al. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower-breaking. *J Gen Virol*, 1993, **74**: 881-887.
- [13] Langeveld S A, Dore J M, Memelink J, et al. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 1531-1541.
- [14] Se T, Kanematsu S. First report of tulip band breaking virus in mosaic diseased tulip in Japan. *Plant Disease*, 2002, **86**: 1405.
- [15] 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

[15] Ohira K , Namba S , Miyagawa M , *et al.* Nucleotide sequence of the coat protein coding region of *Tulip breaking virus*. *Virus Genes* , 1994 , 8 (2) : 165 – 167 .

[16] Van Regenmortel M H V , Fauquet C M , Bishop D H L , *et al.* *Virus Taxonomy* . Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses . New York , San Diego : Academic Press , 2000 , 10 – 14 .

Determination and Analysis of 3' End Genomic Sequence of Two *Lily mottle virus* Isolates Occurred in Zhejiang Province

LIU Wen-Hong^{1 2} HONG Jian^{2*} CHEN Ji-Shuang¹ WANG Chong¹ YE Mei-Qin³
(¹ College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)
(² Center of Analysis and Measurement , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)
(³ Agriculture Bureau of Lishui , Lishui 323000 , China)

Abstract : The cDNAs of 3' end partial sequences of two *Potyvirus* isolates(G , X) were cloned and determined . Multiple alignments of these sequences showed that they belong to *Lily mottle virus*(LMoV) . The sequence homologies , compared with twelve isolates of document references , suggested that the homologies of G , X , ML61 , 1229 , 2b , MD , HZ and J were 85.9% to 100% and these isolates always formed a distinct cluster in the phylogenetic tree topology , and these isolates were classified as LMoV . The homologies of 2b2 , TM and TBV1 were 91.2% to 99.3% , and they were classified as *Tulip breaking virus*(TBV) . The isolate of 2b3 had low homologies with others isolates , and it was classified along as *Rembrandt tulip breaking virus*(ReTBV) . Sequence analysis on N1b nucleotide sequence and 3'-UTR nucleotide sequence of G , X , ML61 , 1229 , J , HZ and TM also suggested that the isolates of G , X , ML61 , 1229 , J , HZ belong to LMoV and TM belong to TBV . The isolates of LMoV had two subgroups . Isolates G and X were divided into different subgroups . But the subgroup determination of LMoV was not related to the host distribution and geological origination . According to our results , we divided all the reported *Potyriviruses* infecting lily and tulip into three viruses , thus as LMoV , TBV and ReTBV .

Key words : *Lily mottle virus* , *Tulip breaking virus* , *Rembrandt tulip breaking virus* , *Lilium cvs.* (Asiatic Hybrids) , Sequence analysis

Foundation item : The Funds Provided by the Ministry Science and Technology (02EFN213300269) ; The Project for The Science and Technology of Zhejiang Province (2002Z32128)

* Corresponding author . Tel : 86-571-86971179 ; E-mail : jhong@zju.edu.cn

Received date : 12-09-2003

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期 , 我刊一些综述类来稿存在一些问题 , 主要表现为 : 篇幅庞大 , 罗列文献 , 内容空泛 , 缺乏观点 . 为使此栏目更加新颖并更具可读性 , 特提出几点说明 , 欢迎大家根据要求 , 踊跃投稿 , 并提出你们对该栏目的建议和想法 .

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review) , 来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献) .
2. 综述的选题要有新意 , 对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值 .
3. 参考文献应控制在 40 篇以内 , 近 3 年发表的文献不少于 10 篇 .
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 , 不要泛泛罗列文献 , 只述不评 .
5. 应结合自己的研究工作 , 就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点 .
6. 欢迎投送“ 能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义 ” 的述评类文章 .