

低温胁迫对黄瓜花叶病毒 CMV-BG 株系 *cp* 基因多态性的影响

张兴桃^{1,3}, 李艳红², 高贵珍^{1,3}, 曹稳根^{1,3}, 刘小阳¹, 王海潮¹, 袁维风¹
(1. 宿州学院化学与生命科学学院, 宿州 234000; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037;
3. 宿州学院特色种植业良种生产工程技术研究中心, 宿州 234000)

摘要: 研究了低温胁迫下黄瓜花叶病毒与三生烟互作后 CMV *cp* 基因序列的变化规律, 并分析了植物 RNA 病毒的进化机制。用黄瓜花叶病毒北京甘蓝分离物 (CMV-BG) 侵染三生烟不同单株, 置于不同温度条件下 (常温和低温) 培养 30 d 后, 对 CMV *cp* 基因进行克隆、序列测定和多态性分析。结果表明, 侵染低温组植物 CMV 的 *cp* 基因多态性 ($P_i = 0.00176$) 高于常温组 ($P_i = 0.00114$), IFEL 分析检测到低温组第 48 个氨基酸位点为正选择位点, 初步表明低温胁迫有助于提高 CMV-BG *cp* 基因序列的多态性, 温度胁迫是植物 RNA 病毒与宿主互作过程中基因序列变异的一种重要的作用力。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 低温; *cp* 基因; 多态性

中图分类号: S436.421.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)02-0292-04

Cloning and sequence analysis of coat protein gene of *Cucumber mosaic virus* under low temperature stress

ZHANG Xing-tao^{1,3}, LI Yan-hong², GAO Gui-zhen^{1,3}, CAO Wen-gen^{1,3},
LIU Xiao-yang¹, WANG Hai-chao¹, YUAN Wei-feng¹

(1. School of Chemistry and Biology, Suzhou University, Suzhou 234000;

2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037;

3. Engineering Research Center of Special Farm Seed Production, Suzhou University, Suzhou 234000)

Abstract: Aiming at studying CMV coat protein gene sequence variation and further analysis the evolutionary mechanism of plant RNA viruses upon low temperature stress, tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN) infected with *cucumber mosaic virus* isolate (CMV-BG) was planted under room temperature and low temperature for 30 d, and then the CMV *cp* gene was cloned and its sequence and polymorphism were analyzed. The results showed that *cp* gene polymorphism ($P_i=0.00176$) in low-temperature group was higher than that in normal temperature group ($P_i=0.00114$), and the 48th amino acid site was a positive selection site in low-temperature group, detected by IFEL. It showed that low temperature stress can improve the CMV-BG *cp* gene polymorphism, and it is an important force for gene sequence evolution of RNA viruses during the interaction between the host and the virus.

Key words: *Cucumber Mosaic Virus*; low temperature; coat protein gene(*cp* gene); polymorphism

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是危害农作物生产的重要病毒之一, 是雀麦花叶病毒科黄瓜花叶病毒属的典型成员, 为典型的三分体 RNA 病毒^[1]。CMV 株系分为性质不同的亚组 I 和亚组 II, CMV-BG 为亚组 I 的成员之一。CMV *cp* 基因位于 RNA 3 上, 编码病毒粒子的外壳蛋白, 起到保护核酸、长距离运输和媒介传播等生物学作用,

往往决定病毒的症状表现。

寄主与病毒在长期的相互作用过程中, 形成了协同进化, 共进化的机制^[2]。一方面, 寄主对侵袭的病毒存在防御反应, 另一方面, 植物病毒也形成了抑制寄主防御的反防御机制, 使寄主的防御作用失效, 从而得以在植物体内增值和移动。植物寄主通过影响病毒基因组复制、病毒在寄主细胞间移动

收稿日期: 2010-09-28

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究一般项目(KJ2009B278Z), 宿州学院科研平台项目(2010YKF25)和宿州学院生物化学与分子生物学重点学科项目(szxyzdxk200901)共同资助。

作者简介: 张兴桃, 男, 讲师。E-mail: zhangxingtao1978@sina.com

及长距离运输来调控病毒在植物体内的系统侵染。

为进一步分析温度胁迫对病毒基因进化的影响, 在 CMV 2b 基因研究的基础上, 本研究分析在低温胁迫下, CMV *cp* 基因序列的变异和突变规律, 验证低温是否为植物 RNA 病毒基因进化的一种作用力。

1 材料与方法

1.1 植物材料及接种处理

本研究所用的三生烟种子、CMV-BG 由中国农业科学院提供。首先在番茄上活化冻存的 CMV-BG, 当三生烟幼苗长至 4~5 片叶时, 通过汁液摩擦方法将被 CMV-BG 侵染的番茄叶片粗提液接种于三生烟倒 2 和倒 3 片叶^[3], 在室温条件下培养 7 d 后, 取 30 株置于 10℃ 的低温条件培养(低温组), 30 株继续在 25℃ 的室温下培养(常温组)30 d^[4]。

1.2 烟草叶片总 RNA 提取—Trizol 法

随机选取常温组(4、2、8、11)和低温组(14、15、17、18)各 4 株的幼嫩叶片 50 mg, 采用 Trizol 法(Invitrogen 公司)提取总 RNA, 1% 变性琼脂糖凝胶检测提取的 RNA 质量, 保存于 -70℃。

1.3 CMV *cp* 基因的获得

以总 RNA 为模板, 根据 GenBank 中报道的 CMV 的 *cp* 基因序列, 用 Primer 5.0 设计并合成 1 对引物

P1: TTACTTTTCTATGGATGC

P2: CTGG ATGGACAACCCGTTCC

由上海生工生物工程公司, 合成采用一步法 RT-PCR 扩增 *cp* 基因。反应体系为 25 μL: 5×Reaction Buffer 5 μL; dNTP(10 mmol·L⁻¹ each)2 μL; P1/P2 (10 pmol·L⁻¹) 各 1 μL; AMV Reverse Transcriptase (5 U·μL⁻¹)1 μL; Tfl DNA Polymerase (5 U·μL⁻¹) 1 μL; RNA 2 μL, Nuclease-free water 12 μL。

RT-PCR 条件为 45℃ 45 min; 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 68℃ 2 min, 25 cycles; 72℃ 10 min。扩增完毕后, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增质量。

1.4 CMV *cp* 基因扩增产物的回收、克隆

采用切胶纯化的方法回收 *cp* 基因片段, 克隆于 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司), 转化大肠杆菌 Top10 菌株, 在 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选, 挑取白色克隆采用菌落 PCR 的方法进一步鉴定阳性克隆后, 摇菌交上海生工生物工程公司测序。

1.5 序列分析

利用 DNASTar 软件分析测序结果, 截取每个克隆的目的基因的全序列, 经人工校对后, 与其他几个分离物序列比对, 利用 Clustal W 分析得到的 32

个 CMV *cp* 序列与母株 CMV-BG *cp* 序列的变异位点; 利用 MEGA 法构建 CMV *cp* 基因系统进化树; 用 DnaSP 4.10 软件分析低温组和常温组序列的多态性位点、核苷酸多态性指数 (*Pi*) 及同义突变位点和非同义突变数; 最后用 IFEL(fixed-effects likelihood method)分析是否存在正负选择位点^[5]。

2 结果与分析

2.1 CMV-BG *cp* 基因序列的系统进化分析

每个样品随机选取 4 个 CMV-BG *cp* 基因的阳性克隆, 校对后, 截取 *cp* 基因片段登录到 GenBank (DQ873527- DQ873558), 利用 Clustal W 与其他几个 CMV 分离物 *cp* 序列(见表 1)的序列进行比对, 然后采用 MEGA 3.1 的 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统进化树(图 1), 进行系统进化分析。

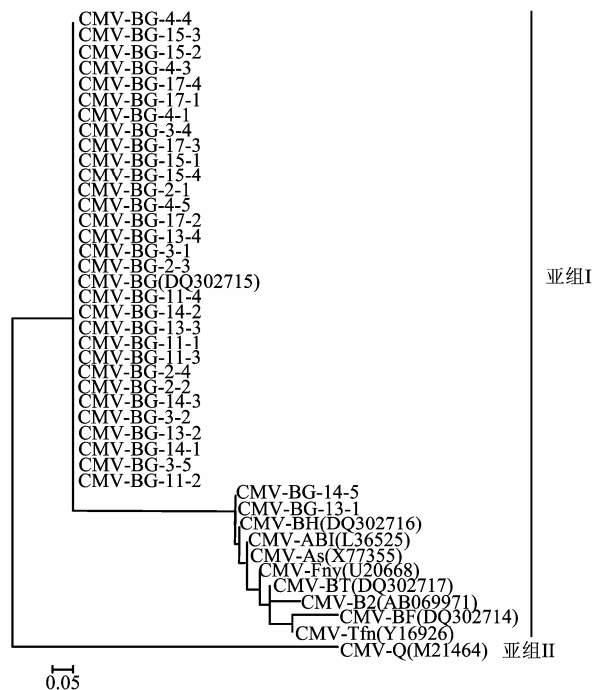


图 1 MEGA 法构建的 CMV-BG *cp* 基因及其他 10 个 CMV *cp* 基因的系统进化树

Figure 1 The NJ tree based on *cp* gene of CMV-BG and other 10 CMV isolates made by MEGA

结果表明: 32 个阳性克隆的 *cp* 序列被分成 2 组, 并且都与母株的序列(DQ302715)距离更近, CMV-BG-15-4 和 18-1 在序列上的变异程度较大, 与图 2 中反映的结果一致; CMV-BG 株系的 *cp* 基因与亚组 I A 的关系更近, 与亚组 I B 中的 As、Fny、Tfn 株系和亚组 II 的 Q 株系遗传距离较远。

表 1 其他 10 个 CMV 株系 *cp* 基因的亚组及基因库登录号
 Table 1 Subgroup and GenBank accession No. of *cp* gene of various cucumber mosaic virus strains used for comparison

亚组 Subgroup	株系 Strain	基因库登录号 GenBank accession
亚组 I Subgroup I	B2	X77855
	ABI	L36525
	As	AB069971
	Fny	U20668
	Tfn	Y16926
	BH	DQ302716
	BT	DQ302717
	B2	AB069971
	Tfn	Y16926
亚组 II Subgroup II	Q	M21464

2.2 CMV-BG *cp* 基因序列变异

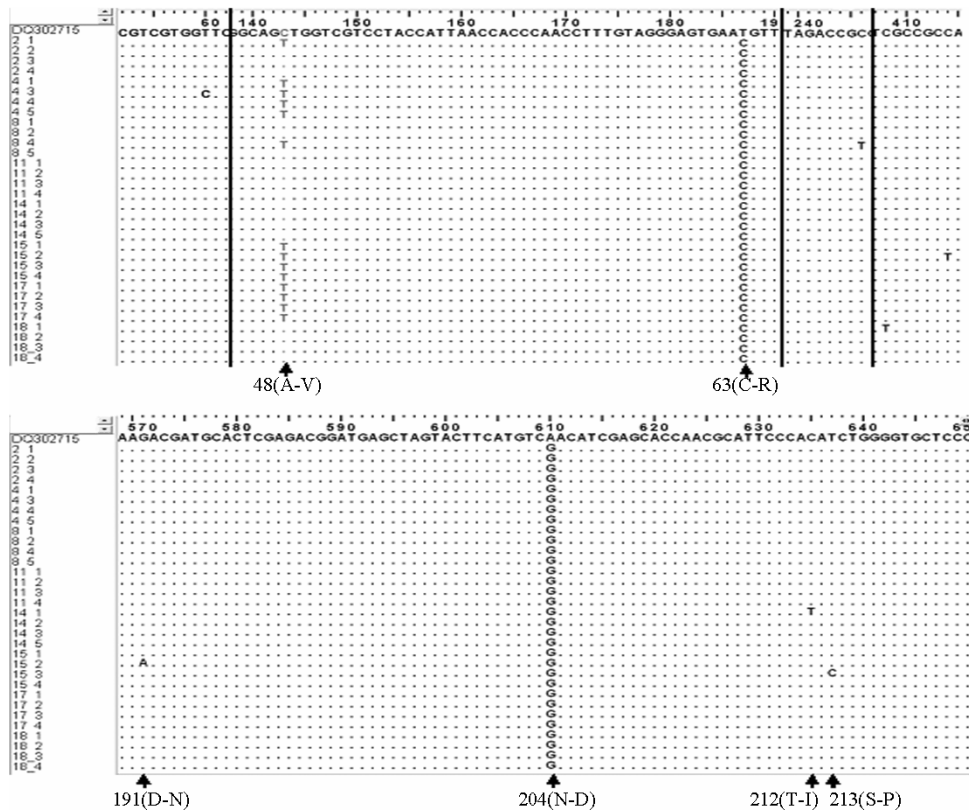
将得到的 *cp* 基因的 32 个阳性克隆序列与母株序列用 Clustal W 方法进行比较, 结果表明: CMV-BG *cp* 基因序列共有 10 个多克隆都发生突变的位点, 为 3 个多态性突变位点和 7 个单态性位点, 占 CP 基因编码区(657 bp)的 1.52%, 其中非同义突

变位点数为 6 个, 同义突变位点数为 4 个 (氨基酸的变化及位点见图 2 标注)。

与母株序列相比, 而 *cp* 基因只在第 48 位氨基酸位点发生了 1 个多克隆相同的突变, 由丙氨酸变为缬氨酸, 但这种变化在低温组和常温组都出现, 并且几率接近, 其他位点都是单态性位点。

2.3 CMV-BG *cp* 基因序列多态性比较

对 *cp* 基因序列多态性分析 (表 2) 表明, 来自低温组植物 *cp* 基因的多态性 ($P_i=0.00176$) 略高于常温组植物 ($P_i = 0.00114$), 表现了低温促进了 *cp* 基因的多态性^[6]。在 *cp* 基因多态性位点中, 低温组发生了 2 个同义突变和 4 个非同义突变; 而在常温组只发生了 2 个同义突变和 1 个非同义突变。通过计算, 在低温组中发现了 $Ka/Ks > 1$ ($Ka/Ks = 1.3147$) 的情况, 而在常温组中没有出现 ($Ka/Ks = 0.7273$)。通过 IFEL 分析的结果检测到第 48 氨基酸位点为正选择 (positive selection) 位点 ($p\text{-value} = 0.05278$)。常温组中虽然也在 143 核苷酸位点发生了多态性突变, 但它并不是正选择位点。这进一步证明, 在不同温度条件下, 不同编码区和编码区的不同位置基因序列变异的频率不同。



箭头标注的是非同义突变的位点 The non-synonymous sites and amino acid changes were labeled at the corresponding sites by arrows

图 2 32 个 CMV-BG *cp* 基因与母株序列比对后的变化位点图

Figure 2 Variation sites after alignment of *cp* gene sequences between the 32 positive clones and their derived sequences (DQ302715)

表 2 CMV-BG *cp* 基因的多态性分析Table 2 Analysis of polymorphism of CMV-BG *cp* gene

参数		低温组	常温组
Parameters		Low-temperature group	Room-temperature group
DNA 多态性位点	单一变化位点数	5(408,414,571, 635,637)	32 (60,246)
Sites of DNA polymorphism	Sites with single change		
	简约信息位点数	1(143)	1 (143)
	Sites with concise information		
核苷酸多态性指数	Index of SNP	0.001 76	0.001 14
同义突变数	Number of synonymous mutation	2	2
非同义突变数	Number of non-synonymous mutation	4	1
<i>Ka/Ks</i> *		1.314 7	0.727 3

*: *Ka*, average number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site; *Ks*, average number of synonymous substitutions per synonymous site; *Ka* and *Ks* are estimated by the method described by Nei and Gojobori.

3 小结与讨论

植物在受病毒侵染后会表现出相应的病毒症状, 病毒在宿主体内繁殖过程中其序列会发生一定程度的突变。而关于 CMV 病毒基因组序列的变异规律, Lin 等^[7]主要通过对来自不同分离物的基因不同区域进行了分析, 发现该病毒可通过基因突变、重组、重排等方式发生序列的变异, 而且不同基因或基因的不同编码区发生变异的频率不同。而对于该病毒在与宿主进行直接的相互作用过程中的序列变化情况报道极少。

本研究中分析 CMV *cp* 基因变异率发现: *cp* 基因序列在不同的宿主个体内确实产生了一些变化, *cp* 基因的核苷酸多态性指数 (*Pi*) 的平均值在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 之间, 略大于 RNA 病毒的平均突变率^[8], 表明 CMV 病毒的基因组序列在该病毒与宿主相互作用过程中更容易发生变化, 低温胁迫有助于提高 CMV *cp* 基因的多态性。

CMV-BG 分离物 *2b* 基因^[4]发生突变数目要多于 *CP* 基因, 其中前者有 26 个突变位点, 而后者只有 10 个。在本研究中 CMV *cp* 基因, 低温组的 *cp* 基因的多态性 ($Pi = 0.00176$) 略高于常温组 ($Pi = 0.00114$)。表明同一病毒的不同基因序列变化的情况非常复杂, *2b* 基因相对 *cp* 基因更易发生突变, 低温胁迫对于加强 *2b* 基因的多态性的效应要强于 *cp* 基因, 主要原因可能与基因的功能相关。Ding 等^[9]发现 *2b* 基因是 CMV 在进化过程中出现的, 是病毒的系统性扩散和病毒的诱导所必需的。Li^[7]等还认识到 *2b* 基因编码的蛋白对于寄主植物 PTGS 具有强烈抑制作用, 是 CMV 抵抗寄主植物防御反应天然存在的 PTGS 抑制子。因此该基因在病毒与宿主的相互作用过程中起着至关重要的作用, 有可能通过加强自身序列的变异来逃避或应对宿主植物

的防御作用; 而 CP 蛋白主要负责病毒粒子的包装、病毒在细胞间的扩散及远距离转移, 其功能对于病毒自身的繁殖至关重要, 因而该基因也相对保守。

CMV-BG 分离物在不同温度条件下, 不同个体表现出不同的变异规律。很多 CMV 的宿主都是在室外生长的, 温度是这些植物始终直接感受的一个外界环境条件。了解不同温度条件下, 植物和病毒的相互作用及病毒序列的变化规律具有非常重要的实际意义。本部分研究初步证实了低温条件有助于加强 CMV-BG *cp* 基因序列的多态性。

参考文献:

- [1] Roossinck M J. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution[J]. Mol Plant Pathol, 2001, 2:59-63.
- [2] Keen N T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interaction[J]. Annu. Rev. Genet, 1990, 24: 447-463.
- [3] 庄木, 王晓武, 谢丙炎, 等. 我国不同 CMV 分离物 *2b* 基因片段的 RT-PCR 及其序列比较[J]. 植物病理学报, 2003, 33 (2): 146-150.
- [4] 张兴姚, 温国蕾, 王晓丹, 等. 低温对黄瓜花叶病毒 CMV-BG *2b* 基因多态性的影响[J]. 植物病理学报, 2008, 38 (1): 51-57.
- [5] Eigen M. New concepts for dealing with the evolution of nucleic acids [J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1987, 52: 307-320.
- [6] Rozas J, Rozas R. DnaSP version3: an intergrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis [J]. Bioinformatics, 1999, 15: 174-175.
- [7] Li H W, Lucy A P, Guo H S, et al. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defense mechanism [J]. Eur Mol Biol Organ., 1999, 18: 2683-2691.
- [8] Meyers G, Tautz N, Theil H J, et al. Host genes in viral genome [M]//Gibbs A J, Calisher C H and Garcia-Arenal F. Molecular basis of virus evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995: 91-102.
- [9] Ding S W, Anderson B J, Haase H R, et al. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome [J]. Virology, 1994, 198: 593-601.

