

来自安徽不同地区黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) *cp* 基因的分子进化分析

李 帅, 单文书, 冯明峰, 蒋西子, 江 彤*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘 要: 为了揭示黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 安徽分离物分子变异及系统进化情况, 从安徽省 5 个地区采集感染 CGMMV 的葫芦科样本。提取感病样本总 RNA, 经 RT-PCR 扩增、克隆和测序, 获得 17 个 CGMMV 分离物的 *cp* 基因序列。序列比对发现, 17 个 CGMMV 安徽分离物的 *cp* 基因核苷酸序列相似性极高, 达 98.4%~100%, 与中国及东亚国家和地区的各个 CGMMV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性也非常高, 达 98.6%~100%, 而与 CGMMV 西班牙分离物和俄罗斯分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性相对较低, 为 90.7%~92.6%。从构建的系统关系树可以看出, 17 个 CGMMV 安徽分离物与中国及东亚国家和地区的各个 CGMMV 分离物形成 1 个单独的分支, 而 CGMMV 俄罗斯与西班牙分离物聚成另 1 个分支, 说明来源于中国和东亚的 CGMMV 亲缘关系较近。

关键词: 黄瓜绿斑驳病毒; *cp* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S436.421.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)04-0593-05

Molecular evolution analysis of *cp* genes of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) from different regions of Anhui Province

LI Shuai, SHAN Wenshu, FENG Mingfeng, JIANG Xizi, JIANG Tong

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to reveal the molecular variation and phylogenetic evolution of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) isolated from Anhui Province, *Cucurbitaceae* plant samples infected with CGMMV were collected from five regions in Anhui province. Total RNA was extracted from the samples, and *cp* genes of 17 CGMMV isolates were obtained by RT-PCR amplification, cloning and sequencing. Sequence comparison revealed that *cp* genes of 17 CGMMV isolates of Anhui province shared a extremely high sequence similarity (98.4%-100%), and also had very high sequence similarity (98.6%-100%) with *cp* genes of CGMMV isolates from China and other countries and regions of East Asia, and had relatively lower sequence similarity (90.7%-92.6%) with *cp* genes of CGMMV isolates from Spain and Russia. It was indicated from the phylogenetic tree that 17 CGMMV isolates of Anhui province and CGMMV isolates from China and other countries and regions of East Asia clustered into a separate branch, and CGMMV isolates from Spain and Russia clustered into another branch. It was illustrated that the CGMMV from China and East Asia had a very close relationship.

Key words: *Cucumber green mottle mosaic virus*; *cp* gene; clone; sequence analysis

黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 最早由英国科学家 Ainsworth 于 1935 年首次报道在黄瓜上为害^[1]。1966 年, 因黄瓜和葫芦引种传入日本, 严重危害西瓜、甜瓜、南瓜等多种葫芦科瓜类作物^[2]。感病植株

生长缓慢、矮化, 病株叶片呈现花叶、皱缩等症^[3]。2004 年厦门出入境检验检疫局从日本进口的南瓜种子上检测到 CGMMV^[4]。2005 年在中国首次报道 CGMMV 侵染广西观赏南瓜, 此后 CGMMV 相继在

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303028) 资助。

作者简介: 李 帅, 硕士研究生。

* 通信作者: 江 彤, 副教授。E-mail: jiangtong4650@sina.com

我国辽宁、北京、甘肃、海南等地区发生为害，造成大田瓜类作物的毁灭性损失^[5]。2006年12月农业部发布了第788号公告，将CGMMV确定为全国农业植物检疫性有害生物^[6]。

CGMMV属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)，抗逆性极强，常温下可保持数月侵染力，短距离通过汁液传毒，种子带毒是其远距离传毒的主要方式^[7]。CGMMV是一种正单链RNA病毒，粒体直杆状(300×18 nm)^[8]，基因组全长6422~6424 nts。已知编码4个蛋白，分别是129 kDa和186 kDa的复制酶蛋白、运动蛋白(MP)和外壳蛋白(CP)^[9]。

CGMMV的遗传多样性是其基因组核苷酸序列变异的表现，只有病毒的基因组核苷酸序列才能真实地反映出CGMMV株系差异的本质。来源于不同地区的CGMMV分离物常发生一定程度的分子变异，一般CGMMV的cp基因核苷酸序列差异能够较准确地反映其全基因组的变异情况。目前，国内的学者也做过一些有关CGMMV的cp基因测序工作，钟敏等^[10]发现河北CGMMV不同分离物的cp基因聚成一组，与日韩等亚洲国家分离物亲缘关系较近；陈红运等^[11]测定了我国辽宁省CGMMV分离物的cp基因序列，序列比对发现与2个日本和2个韩国的CGMMV分离物序列相似性达100%；杜江等^[12]分析了我国山西地区CGMMV cp基因序列，与我国内陆地区的分离物同源性最为相近。

近年来，CGMMV在安徽各地区迅速蔓延，严

重影响了葫芦科植物的产量和品质，而安徽各地区CGMMV基因组信息、分子变异及系统进化情况尚不清楚。本研究拟在安徽省5个代表性地区采集CGMMV病样，采用分子生物学手段进行检测与鉴定，分析各地区CGMMV分离物cp基因序列差异，以明确安徽省CGMMV的分子变异和地理起源，为选育抗病品种提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 从安徽省淮北市、凤台县、肥西县、岳西县和黄山市5地区，采集表现明显花叶症状的葫芦科甜瓜(*Cucumis melo*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)和丝瓜(*Luffa cylindrica*)叶片样本，保存于-80℃冰箱。

1.1.2 菌种与载体 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α由本实验室保存，克隆载体pMD18-T simple Vector购自TaKaRa公司。

1.1.3 主要试剂 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、Agarose琼脂糖、DNA marker、RNA提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司，Solution连接酶购自TaKaRa公司，质粒小量提取试剂盒购自天根生化有限公司，氨苄霉素(Amp)购自北京索莱宝科技有限公司，逆转录试剂盒购自Fermentas公司，其他化学试剂均为国药分析纯。

表1 CGMMV各分离物来源及其cp基因GenBank登录号
Table 1 Sources of CGMMV isolates and their GenBank accession number of cp genes

分离物 Isolate	来源地 Source	GenBank 登录号 GenBank accession number	寄主 Host
chbb1	河北 Hebei	KJ658959	西瓜 <i>C. lanatus</i>
LiaoNing	辽宁 Liaoning	DQ217778	西瓜 <i>C. lanatus</i>
Taian	山东 Shandong	KJ754197	甜瓜 <i>C. melo</i>
XG	浙江 Zhejiang	KP868654	黄瓜 <i>C. sativus</i>
JSHZ12	江苏 Jiangsu	KC852073	西瓜 <i>C. lanatus</i>
hn	河南 Henan	KC851866	西瓜 <i>C. lanatus</i>
GD-LZ	广东 Guangdong	JN605349	西瓜 <i>C. lanatus</i>
Wh3	湖北 Hebei	JF432069	南瓜 <i>C. moschata</i>
GMMV11	台湾 Taiwan	HQ692886	葫芦 <i>L. siceraria</i>
KOM	韩国 Korea	AF417243	甜瓜 <i>C. melo</i>
Japan	日本 Japan	JN605349	西瓜 <i>C. lanatus</i>
Alm08	西班牙 Spain	GQ411361	黄瓜 <i>C. sativus</i>
MC-2	俄罗斯 Russia	GQ495274	黄瓜 <i>C. sativus</i>
Indonesia	印度尼西亚 Indonesia	AB194531	葫芦 <i>L. siceraria</i>

1.2 方法

1.2.1 RNA提取 取冷冻叶片样本约0.1 g，于液氮

条件下充分研磨，用RNA试剂盒提取病叶总RNA，方法按公司提供的产品说明书进行。

1.2.2 引物设计与合成 根据 CGMMV (GenBank: EF611826) *cp* 基因两侧的保守序列设计引物:

CGMMV-*cp*/F: 5'-GTTATAGGTCTAGGTCGCAG-3',
CGMMV-*cp*/R: 5'-ACCAATGAG CAAACCGTTCG-3'
引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.2.3 cDNA 合成及 PCR 扩增 参考 Fermentas 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, 再以 cDNA 第一链为模板, 用引物 CGMMV-*cp*/F、CGMMV-*cp*/R 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 22 s, 30 个循环。

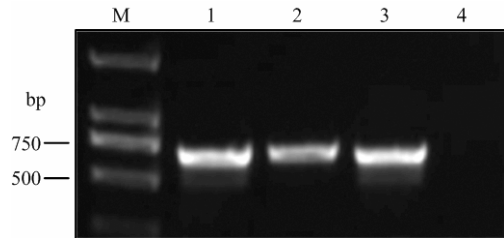
1.2.4 PCR 产物的克隆 利用 DNA 纯化试剂盒纯化并回收目的片段, 连接 pMD18-T simple Vector 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 阳性克隆送上海英潍捷基生物公司测序。

1.2.5 序列测定和序列分析 利用软件 DNASTar 和 DNAMAN Version 5.22 进行序列分析。多序列比较采用 DNASTar Clustal V 方法, 系统关系树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法 (Neighbor-joining)。用于序列比对的 CGMMV 各分离物来源及 GenBank 登录号见表 1。

2 结果与分析

2.1 CGMMV *cp* 基因的克隆

以植株样本 cDNA 第一条链为模板, 用引物 CGMMV-*cp*/F、CGMMV-*cp*/R 进行 PCR 扩增, 均可扩增出 1 条约 700 bp 的特异性条带, 片段大小与预期结果相符 (图 1)。



M. DNA marker; 1. CGMMV-AHHB21; 2. CGMMV-AHHB32; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照

M. DNA marker; 1. CGMMV-AHHB21; 2. CGMMV-AHHB32; 3. Positive control; 4. Negative control

图 1 CGMMV-AHHB21 和 CGMMV-AHHB32 *cp* 基因的 RT-PCR 产物

Figure 1 RT-PCR products of *cp* gene of CGMMV-AHHB21 and CGMMV-AHHB32

表 2 17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp* 基因的 GenBank 登录号

Table 2 GenBank accession number of 17 *cp* genes of CGMMV Anhui isolates

分离物 Isolates	来源地 Sources	GenBank 登录号 GenBank accession numbers	寄主 Host
AH-FT4	凤台 Fengtai	KT984755	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-FT179	凤台 Fengtai	KU175628	西瓜 <i>C. lanatus</i>
AH-FT112	凤台 Fengtai	KU048526	西瓜 <i>C. lanatus</i>
AH-FT108	凤台 Fengtai	KU048525	黄瓜 <i>C. sativus</i>
AH-FT86	凤台 Fengtai	KU048524	甜瓜 <i>C. melo</i>
AH-FT10	凤台 Fengtai	KU048523	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-FT197	凤台 Fengtai	KU175639	甜瓜 <i>C. melo</i>
AH-FX171	肥西 Feixi	KU175638	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-FX137	肥西 Feixi	KU175637	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-HB2	淮北 Huaibei	KU175636	甜瓜 <i>C. melo</i>
AH-HB1	淮北 Huaibei	KU175635	甜瓜 <i>C. melo</i>
AH-HB32	淮北 Huaibei	KU175634	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-HB21	淮北 Huaibei	KU175633	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-HS1	黄山 Huangshan	KU175630	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-HS154	黄山 Huangshan	KU175631	丝瓜 <i>L. cylindrical</i>
AH-YX3	岳西 Yuexi	KU175632	南瓜 <i>C. moschata</i>
AH-YX2	岳西 Yuexi	KT981876	黄瓜 <i>C. sativus</i>

2.2 CGMMV *cp* 基因的克隆和测序

将扩增出的 17 个目的片段克隆并测序, 序列全长均为 700 nts, 含有完整的 *cp* 基因, 长度为 486 nts, 编码 161 个氨基酸。17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp*

基因序列 GenBank 登录号见表 2。

2.3 CGMMV *cp* 基因的序列比较及分子进化分析

利用 DNASTar 软件将本研究得到的 17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp* 基因核苷酸序列与

GenBank 已登录的其他地区 CGMMV 分离物的 *cp* 基因核苷酸序列进行相似性比较, 结果表明, 17 个 CGMMV 安徽分离物的 *cp* 基因核苷酸序列相似性极高, 达 98.4%-100%, 与中国各省份及东亚国家和地区的各个 CGMMV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性也非常高, 达 98.6%-100%, 其中 5 个 CGMMV 安徽分离物 AH-FT4、AH-FT10、AH-FT84、AH-FT197 和 AH-HB1 与 CGMMV 河北分离物 (HeBei-chbb1)、浙江分离物 (ZheJiang-XG) 和山东分离物 (ShanDong-Taian) 的 *cp* 基因核苷酸序列相似性达 100%。而 17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp* 基因与 CGMMV 西班牙分离物和俄罗斯分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性相对较低, 为 90.7%-92.6% (以上数据未列出)。

聚成 1 个分支, 17 个 CGMMV 安徽分离物与国内各省及台湾地区 CGMMV 分离物以及日本、韩国和印度尼西亚 CGMMV 分离物聚成另 1 个分支。说明不同 CGMMV 分离物的 *cp* 基因变异表现出一定的地域相关性。

3 讨论与结论

本研究克隆了侵染安徽葫芦科植株 CGMMV 17 个分离物的 *cp* 基因, 17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp* 基因与中国和东亚地区各个 CGMMV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性很高, 在 *cp* 基因系统关系树中也聚集成 1 个分支, 说明中国和东亚地区的 CGMMV 亲缘关系较近; 而 17 个 CGMMV 安徽分离物 *cp* 基因与西班牙、俄罗斯 CGMMV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列相似性相对较低, 亲缘关系也相对较远, 可能是因为地理来源不同, CGMMV *cp* 基因存在着一定程度的分子变异。

CGMMV *cp* 基因核苷酸序列的差异能够较准确地反映其全基因组的变异情况^[13]。本研究利用分子生物学技术检测与鉴定了 17 个安徽 CGMMV 分离物, 17 个分离物的 *cp* 基因与相邻的山东省、浙江省已经报道的 CGMMV 各分离物的 *cp* 基因核苷酸序列相似性最高, 可能是因为 CGMMV 通过频繁的种质交流与调运传播到了安徽省。分析发现, CGMMV 中国分离物与周边国家日本、韩国和印度尼西亚 CGMMV 分离物亲缘关系较近, 推测 CGMMV 中国分离物可能来源于周边国家, 体现了加强种子检疫的重要性。

目前, 选育抗病品种是防治病毒病的有效手段, 用于品种抗病性鉴定的接种毒源一般来源于品种推广的地区。CGMMV 是一种致病性强、危害严重、易通过种子远距离传播的病毒, 防治难度很大, 对葫芦科作物具有巨大的潜在威胁^[14], 选育抗病品种是防治 CGMMV 的重要措施。因此, 明晰 CGMMV 的基因组信息、分子变异及系统进化情况是解决抗病品种选育问题的关键, 安徽省 CGMMV 分离物的分子进化分析也为下一步选育抗病品种提供了重要的分子依据。

参考文献:

[1] FRANCKI R, HU J, PALUKAITIS P. Taxonomy of cucurbit-infecting tobamoviruses as determined by serological and molecular hybridization analyses [J]. *Intervirology*, 1986, 26 (3): 156-163.
 [2] 冯兰香, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 检疫性黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测和防疫控制[J]. *中国蔬菜*, 2007(9): 34-38.

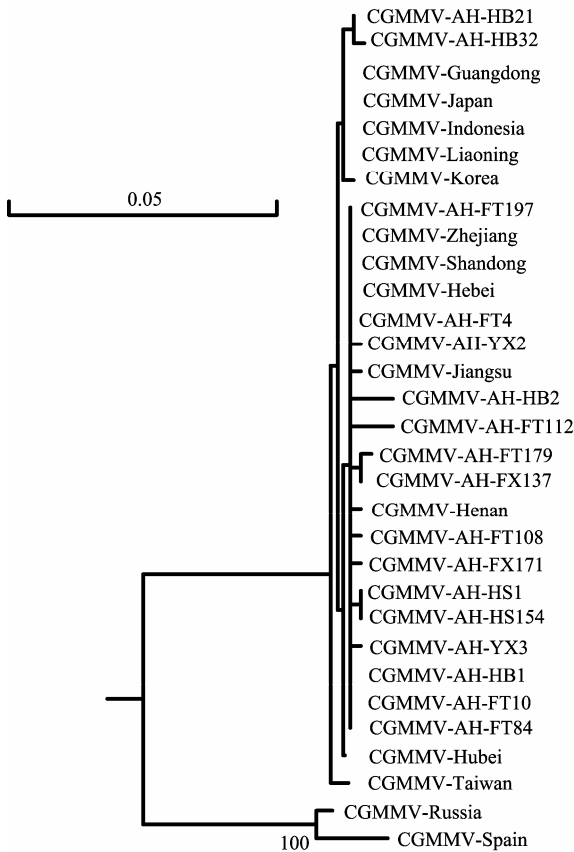


图 2 基于 17 个 CGMMV 安徽分离物的 *cp* 基因与其它 14 个 CGMMV *cp* 基因核苷酸序列构建的系统关系树

Figure 2 Relationship dendrogram based on the alignment of nucleotide sequences of *cp* genes of 17 CGMMV Anhui isolates and *cp* genes of other 14 CGMMV

构建 17 个 CGMMV 安徽分离物的 *cp* 基因与 GenBank 已登录的其他 14 个 CGMMV *cp* 基因的系统关系树 (图 2)。可以看出, 所有 CGMMV 分离物聚成 2 个分支, CGMMV 俄罗斯与西班牙分离物

- [3] 秦碧霞, 蔡健和, 刘志明, 等. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. 植物检疫, 2005, 19(4): 198-200.
- [4] 王峰, 任春梅, 季英华, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒海南分离物基因组测定与毒源分析[J]. 植物保护, 2014, 40(6): 75-81.
- [5] 宋顺华, 吴萍, 宫国义, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病的发生及防控策略[J]. 植物保护, 2014(8): 105-108.
- [6] 周玲玲, 吴元华, 赵秀香, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒生物学特性及对西瓜生长的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39 (4): 417-422.
- [7] YOON J Y, MIN B E, CHOI S H, et al. Completion of nucleotide sequence and generation of highly infectious transcripts to cucurbits from full-length cDNA clone of *Kyuri green mottle mosaic virus* [J]. Arch Virol, 2001, 146 (11): 2085-2096.
- [8] LIU H W, LUO L X, LI J Q, et al. Pollen and seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in cucumber [J]. Plant Pathol, 2014, 63(1): 72-77.
- [9] 田永蕾, 刘冬梅, 张永江, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒北京和山东分离物生物学测定及其基因组比较[J]. 植物检疫, 2009, 23(6): 1-6.
- [10] 钟敏, 赵绪生, 何乙坤, 等. 黄瓜绿斑驳病毒河北分离物外壳蛋白基因序列分析及其分组[J]. 河北大学学报, 2015, 38(1): 92-97.
- [11] 陈红运, 林石明, 陈青, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物全基因组序列测定[J]. 病毒学报, 2009, 25(1): 68-72.
- [12] 杜江, 成媛媛, 牛二波, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒山西西瓜分离物外壳蛋白基因序列分析[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 142-145.
- [13] TETSUO M, RYOITI K, TAKESHI O, et al. Nucleotide sequence of the coat protein cistron and the 3' noncoding region of *Cucumber green mottle mosaic virus* (watermelon strain) RNA [J]. Virology, 1983, 127(1): 54-64.
- [14] ALI M E, YUTAKA T, KAPPEI K, et al. Molecular analysis of transgenic melon plants showing virus resistance conferred by direct repeat of movement gene of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. Plant Cell Rep, 2012, 31: 1371-1377.