

张成玲, 赵永强, 孙厚俊, 等. 甘薯卷叶病毒复制相关蛋白部分基因克隆及分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 298-303.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.012

甘薯卷叶病毒复制相关蛋白部分基因克隆及分析

张成玲, 赵永强, 孙厚俊, 杨冬静, 徐振, 谢逸萍

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 农业部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131)

摘要: 为明确甘薯卷叶病毒基因的分子特性及其变异, 从江苏省徐州市表现卷叶、黄化等症状的甘薯上获得 5 个分离物 (SPLCV1-1、SPLCV2-2、SPLCV3-1、SPLCV3-2、SPLCV4-1), 利用 PCR 方法扩增克隆了这 5 个分离物的 AC1 部分基因序列, 进行分析。结果表明, 扩增到的 5 个分离物基因序列均为 452 个碱基, 核苷酸序列一致率较高, 为 91.8% ~ 99.8%, 氨基酸序列一致率为 94.0% ~ 100.0%, 且氨基酸序列的变异集中在 143 ~ 166 位点。在构建的系统进化树上, SPLCV 分离物分为 2 个组, 其中组 I 包括日本、韩国、印度、巴西、美国及中国的部分分离物, 本研究所得到的 4 个分离物也位于该组中, 其中 SPLCV2-2、SPLCV3-1 和本研究室 2012 年得到的江苏省邳州港上分离物 SPLCV5-1 聚为一簇; 组 II 分离物均为中国分离物, 且本研究得到的分离物 SPLCV3-2 也位于该组中。

关键词: 甘薯卷叶病毒; AC1 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0298-06

Cloning and sequence analysis of replication-associated protein partial genes of sweet potato leaf curl virus isolates

ZHANG Cheng-ling, ZHAO Yong-qiang, SUN Hou-jun, YANG Dong-jing, XU Zhen, XIE Yi-ping

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweet Potato, Ministry of Agriculture, Xuzhou 221131, China)

Abstract: To characterize the gene and gene variation of sweet potato leaf curl virus (SPLCV) infecting *Ipomoea batatas* in China, sweet potatoes showing yellow vein and curl leaf symptoms were collected from Xuzhou, Jiangsu province, and AC1 gene fragments of five isolates from sweet potato named SPLCV1-1, SPLCV2-2, SPLCV3-1, SPLCV3-2, SPLCV4-1 were amplified by PCR and analyzed. The nucleotide sequences and amino acid sequences showed similarities of 91.8%–99.8% and 94.0%–100.0%, respectively for the five isolates containing 452 base pairs and 150 amino acids. The variation of amino acid occurred in loci 143–166 of the AC1 gene. Phylogenetic trees constructed with Japanese, Korean, Indian and Chinese isolates revealed that the isolates were divided into two groups. Group I included the isolates collected from Japan, Korea, India, Brazil, America and China, and four isolates obtained in this study, SPLCV1-1, SPLCV2-2, SPLCV3-1, and SPLCV4-1. SPLCV2-2, SPLCV3-1, and SPLCV5-1 collected from Pizhou, Jiangsu province, were grouped into a cluster. Isolates in group came from China, including SPLCV3-2.

lected from Japan, Korea, India, Brazil, America and China, and four isolates obtained in this study, SPLCV1-1, SPLCV2-2, SPLCV3-1, and SPLCV4-1). SPLCV2-2, SPLCV3-1, and SPLCV5-1 collected from Pizhou, Jiangsu province, were grouped into a cluster. Isolates in group came from China, including SPLCV3-2.

Key words: sweetpotato leaf curl virus; AC1 gene; cloning; sequence analysis

收稿日期: 2014-10-30

基金项目: 江苏省农业科技自主创新探索性项目 [CX(13)5080]; 江苏省自然科学基金项目 (BK20140230); 国家甘薯产业技术体系项目 (CARS-11-B-09)

作者简介: 张成玲 (1983-), 女, 山东沂源人, 博士, 副研究员, 主要从事甘薯病虫害研究。 (E-mail) zhchling5291@163.com

通讯作者: 谢逸萍, (E-mail) xieyiping6216@163.com

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 是世界上重要的粮食、能源和工业原料作物,具有高产、稳产、适应性强、尤其能在干旱和贫瘠土壤上生长等优点,广泛种植于 100 多个国家^[1-2]。中国是世界上最大的甘薯生产国,据联合国粮食农业组织 (FAO) 等统计,本世纪,中国甘薯总种植面积大约 $(3.5 \sim 5.5) \times 10^6 \text{ hm}^2$, 约占世界甘薯种植面积的 45% 以上,总产量占世界甘薯产量的 75% 以上^[3-4]。甘薯病毒病的发生是影响甘薯产量和品质提升的重要限制性因素,其中,甘薯卷叶病毒 (SPLCV) 是近几年甘薯上发生危害最严重的病毒之一^[5-7],其危害阻碍了甘薯产业的发展。

SPLCV 侵染甘薯后引起叶片上卷,叶脉或叶片变黄,严重时导致植株矮化,造成 20% ~ 80% 的甘薯产量损失^[8]。2012 ~ 2014 年,苏、鲁、豫、皖、鄂、浙等地甘薯苗圃病害调查发现,甘薯卷叶病毒的发生呈现上升趋势,并且部分品种病害的发生率达到 90% 以上。田间病害调查发现,早期病害病症表现严重,但随温度的升高,病害呈现隐症现象,后期收获产量损失严重。

SPLCV 属双生病毒科 (Geminiviridae), 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*), 基因组为单组分,大小约为 2.8 kb, 编码 6 个开放阅读框: AV1、AV2、AC1、AC2、AC3 和 AC4。AV1 (Coat protein, CP) 和 AV2 (CP 的前体蛋白) 位于病毒正义链上,其余在互补链上^[9-10]。AC1 编码病毒复制相关蛋白 (Replication-associated protein, ReP), 具有 DNA 解旋酶、内切酶及连接酶等多种活性,参与病毒基因组 DNA 的复制^[11], 常与 AV1 被应用于种类鉴定。目前,在韩国^[12]、以色列^[13]、美国^[14]、日本^[15]、巴西^[16]、阿根廷^[17] 等国已有甘薯卷叶病毒发生的报道,并获得其基因克隆。Park 等通过 PCR 扩增获得 SPLCV 基因,并对各个基因进行核苷酸和氨基酸一致率分析,Haenam 1 分离物 AC1 基因与巴西分离物 FJ969834 核苷酸一致率最高,为 98.6%; 系统进化树分析结果显示,韩国卷叶病毒分离物分为 2 组,组 1 与中国和美国的分离物相近^[12]。2006 年, Luan 等^[5,18] 首先在中国甘薯上发现了 SPLCV 的存在,并对其全基因组进行测定。乔贞贞等^[7] 通过表达 CP 基因,制备了特异性抗体,建立了高效快速的血清检测技术。本研究对表现卷叶和黄化症

状的 SPLCV 样品进行 AC1 部分基因扩增,并对其系统进化分析,为病毒的分类鉴定提供分子技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

样品于 2013 ~ 2014 年采自江苏省徐州市徐淮地区徐州农业科学研究所试验基地表现卷叶、黄化等症 (图 1) 的不同甘薯品种。

大肠杆菌菌株 DH5 α 、DNA 分子量标准 DL2000 均购自北京百泰克生物技术有限公司, pMD18-T 载体、DNA 提取试剂盒、DNA 聚合酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。其他生化试剂及普通化学试剂均为进口或国产生化级或分析纯级。

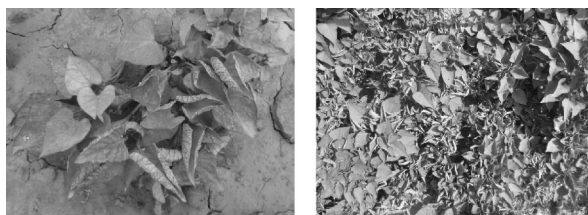


图 1 甘薯卷叶病毒侵染甘薯引起的症状

Fig. 1 Symptoms of sweet potato plants infected with sweet potato leaf curl virus

1.2 SPLCV 鉴定及基因扩增

根据 GenBank 中登录的甘薯卷叶病毒的基因序列,参考 Lotrakul 等^[19] 及 Li 等^[20] 的文献,设计甘薯卷叶病毒 AC1 基因扩增特异引物,交上海生工生物工程股份有限公司合成。上游引物 PW285-F: 5'-TA-ATTCGAAGTGCAGTTCCGTATTTACAGTT-3'; 下游引物 PW285-R: 5'-GCTAGAGGAGGCCTGCAGACTGCTAACGACG-3'。利用 DNA 提取试剂盒提取采集样品的总 DNA。以总 DNA 为模板,扩增 AC1 部分序列。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 45 s, 70 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 70 °C 延伸 10 min。

1.3 SPLCV 扩增产物序列测定

PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖电泳,分离目的片段,并连接到 pMD18-T 载体中,转化大肠杆菌。提取质粒并进行 PCR 鉴定^[21]。阳性克隆送交上海

生工生物工程股份有限公司进行核苷酸序列测定,每个分离物选取 3~5 个重组子进行序列测定,比较后确定其核苷酸序列。

1.4 SPLCV 基因的核苷酸序列系统进化分析

将序列在 NCBI 上进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),下载相关序列,利用 DNASTar 软件包(DNASTar Inc., Madison, WI, USA)、DNAMAN 等软件进行序列比对。用 MEGA6.0 等软件以邻接法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 SPLCV 分离物 AC1 基因的扩增及序列分析

PCR 扩增后电泳结果显示,在分子量为 450 bp 左右出现电泳条带,没有其他非特异性 DNA 条带,其大小与已报道的基因分子量相似,说明

此条带即为甘薯卷叶病毒 AC1 目的基因的扩增产物。经连接、转化、提取质粒鉴定后,阳性克隆测序,共获得 5 个分离物。这 5 个分离物来自不同甘薯品种,SPLCV1-1 和 SPLCV2-2 寄主为济黑 1 号,SPLCV3-1 和 SPLCV3-2 寄主为蜂蜜罐,SPLCV4-1 寄主为徐薯 22。5 个分离物大小均为 452 bp。经 DNAMAN 比对后发现,5 个 SPLCV 分离物之间核苷酸序列的一致率较高,为 91.8%~99.8%,氨基酸序列一致率为 94.0%~100%。其中,SPLCV2-2 与 SPLCV3-1 核苷酸序列和氨基酸序列一致率最高,分别为 99.8% 和 100.0%,SPLCV3-2 与 SPLCV1-1 核苷酸序列和氨基酸序列一致率最低,分别为 91.8% 和 94.0% (图 2)。

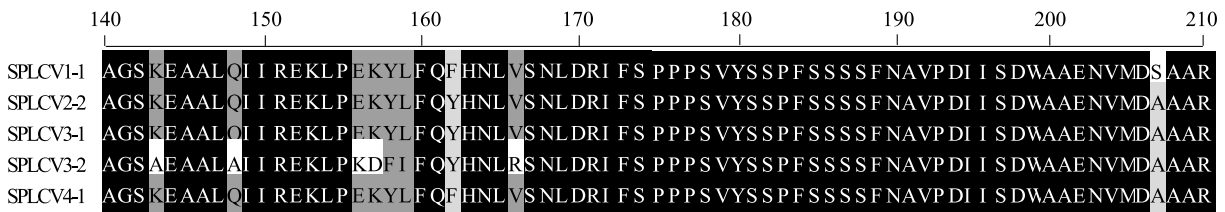


图 2 5 个分离物的氨基酸一致率分析

Fig. 2 Alignment of amino acid sequence in five isolates

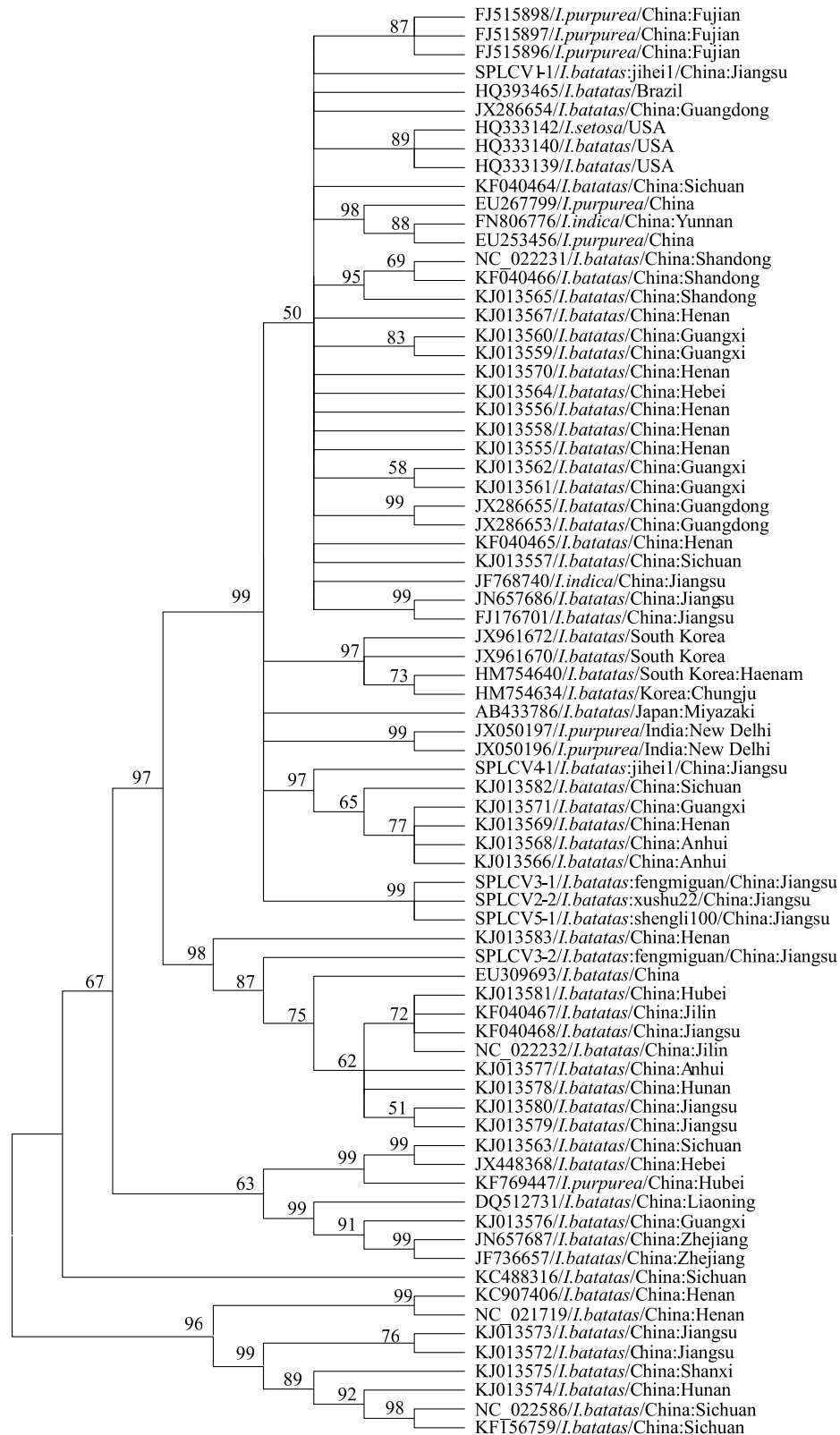
5 个分离物中,SPLCV3-2 氨基酸序列变异最大,变异位点为 AC1 蛋白的 143 A(K)、148 A(Q)、156 K(E)、157D(K)、158 F(Y)、159 I(L)、166 R(V);其次为 SPLCV1-1,变异位点为 162F(Y)和 207 S(A);SPLCV4-1 的 162 位氨基酸为 F,其余分离物为 Y(图 2)。

将 5 个分离物分别与 GenBank 中的序列进行比对,结果表明,5 个分离物中,SPLCV2-2 和 SPLCV3-1 与基因号为 AB433786 的日本分离物核苷酸序列和氨基酸序列一致率最高,核苷酸序列一致率分别为 97.8% 和 98.0%,氨基酸序列一致率均为 98.7%;SPLCV1-1 与中国圆叶牵牛上分离物 FJ515898 一致率最高,核苷酸序列和氨基酸序列一致率分别为 99.6% 和 99.3%;SPLCV3-2 与中国分离物 KF040468 核苷酸序列和氨基酸序列一致率最高,分别为 98.2% 和 99.3%;SPLCV4-1 与韩国分离物 JX961672 核苷酸序列和氨基酸序列一致率最高,分

别为 98.5% 和 99.3%。

2.2 核苷酸序列系统进化分析

将 NCBI 上登记的与 5 个分离物一致率较高的分离物、中国分离物及本研究室 2012 年得到的分离物 SPLCV5-1,利用 MEGA6 软件邻接法(Neighbour-joining, NJ)法构建系统进化树。结果(图 3)显示,SPLCV 分离物分为组 I 和组 II 2 个组,组 I 分离物包括日本、韩国、印度、巴西、美国及中国的部分分离物,本研究得到的分离物中有 4 个也位于该组中,其中分离物 SPLCV2-2、SPLCV3-1 和江苏省邳州港上大田分离物 SPLCV5-1 单独聚为一簇,SPLCV4-1 单独一支。中国分离物主要分布在四川、江苏、福建、云南等 16 个省,其中江苏、河南等地分离物居多。组 II 只有中国分离物,分布在江苏、四川、吉林、湖北等地,本研所得的 SPLCV3-2 分离物位于该组中。



系统进化树上仅显示 Bootstrap 值大于 50% 的分支。分离物表示方法为:登录号/寄主/地点。

图 3 用 MEGA6.0 软件中邻接法构建的甘薯卷叶病毒分离物 ACI 部分基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees constructed by neighbour-joining based on ACI gene fragment nucleotide sequences of sweet potato leaf curl virus isolates

组 I 分离物寄主包括甘薯、圆叶牵牛、巴西牵牛等植物,而组 II 分离物寄主相对单一,主要为甘薯,只有 KF769447 分离物寄主为圆叶牵牛。SPLCV3-1 与 SPLCV3-2 均为甘薯蜂蜜罐上采集到的,但分在了不同组中,同样 HQ333142 分离物寄主为巴西牵牛,与寄主为甘薯的分离物聚为一簇,说明在利用 *ACI* 部分基因构建的系统进化树中,SPLCV 分离物无明显的寄主和甘薯品种相关性。

3 讨论

本研究通过 PCR 扩增获得了甘薯 SPLCV 5 个分离物的 *ACI* 部分基因,通过分子生物学方法分析了其基因序列。结果表明,本研究获得的 5 个分离物核苷酸序列和氨基酸序列一致率分别在 91.8% 和 94.0% 以上。构建的系统进化树显示,本研究所得的 4 个分离物位于组 I 中,其中 SPLCV1-1 和 SPLCV4-1 聚为一大簇,SPLCV2-2、SPLCV3-1 及江苏省邳州港上大田分离物 SPLCV5-1 聚为一簇。SPLCV3-2 与中国大部分分离物位于组 II 中。甘薯卷叶病毒病在中国从北到南均有发生,与全国各地引种及白粉虱持久性传毒有关。系统进化分析结果表明,SPLCV 在中国无明显的寄主相关性。韩国、日本、印度等地分离物与本研究所分离物的一致率较高,可能与中国与这几个国家的甘薯种质资源交流频繁有关。

ACI 基因与病毒的复制有关,与 *AC2*、*AC3* 等基因编码的蛋白质位于植物细胞核内^[22],其基因的变异可影响其在植物细胞中的分布和基因功能。本研究所得的基因变异多集中在 143~166 位氨基酸,这些变异有非极性氨基酸(F/A)突变为极性氨基酸(K/Q/Y)、极性氨基酸(R/S)突变为非极性氨基酸(V/A),亦有极性氨基酸之间的突变。

甘薯卷叶病毒是近几年发生呈现上升趋势的一种病毒,由白粉虱持久传毒,田间扩展迅速^[19,23];苗床发病,可影响种苗的调运。田间不同的甘薯品种甘薯卷叶病毒的发病率不同,据调查,徐薯 22、蜂蜜罐及济黑 1 号等品种发病严重,而胜利百号等品种发病相对较轻,但未发现抗病品种。对病毒的特性及其变异的研究,有助于我们了解寄主植物、环境对

病毒变异的影响,通过这些遗传变异信息便于我们设计防治策略或针对某一病毒类群选育抗病品种^[24-25]。

参考文献:

- [1] 靳摇容,张爱君,史新敏,等. 干旱胁迫下钾对甘薯幼苗光合特性及根系活力的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(5):992-996.
- [2] 王新华,尚 赏,郭书亚,等. 2BX 型玉米-甘薯间作系统优势分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):106-109.
- [3] 马代夫,刘庆昌. 中国甘薯育种与产业化[M]. 北京:中国农业大学出版社,2005.
- [4] 马代夫,李 强,曹清河,等. 中国甘薯产业及产业技术的发展与展望[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):969-973.
- [5] LUAN Y S, ZHANG J, LIU D M, et al. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae[J]. Virus Genes, 2007, 35:379-385.
- [6] VALVERDE R A, CLARK C A, VALKONEN J P T. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato[J]. Plant Viruses, 2007, 1:116-126.
- [7] 乔贞贞,秦艳红,乔 奇,等. 甘薯卷叶病毒江苏分离物基因组全长序列测定及其外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[J]. 河南农业科学,2012,41(4):86-89.
- [8] CLARK C A, HOY M W. Effects of common viruses on yield and quality of Beauregard sweet potato in Louisiana[J]. Plant Disease, 2006, 90(1):83-88.
- [9] HARRISON B D, SWANSON M M, FARGETTE D. Begomovirus coat protein: serology, variation and functions[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2002, 60:257-271.
- [10] ROJAS M R, JIANG H, SALATI R, et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus[J]. Virology, 2001, 291:110-125.
- [11] LAUFS J, TRAUT W, HEYRAUD F, et al. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus[J]. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 1995, 92:3879-3883.
- [12] PARK J, KIM S, CHOI E, et al. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus (SPLCV) isolates from Korea: phylogenetic relationship and recombination analysis[J]. Acta Virologica, 2011, 55: 327-335.
- [13] COHEN J, MILGRAM M, ANTIGNUS Y, et al. Ipomoea crinkle leaf curl caused by a whitefly-transmitted gemini-like virus[J]. Annals of Applied Biology, 1997, 131: 273-282.
- [14] LOTRAKUL P, VALVERDE R A, CLARK C A, et al. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States[J].

- Plant Disease, 1998, 82: 1253-1257.
- [15] ONUKI M, HANADA K. PCR amplification and partial nucleotide sequences of three dicot-infecting geminiviruses occurring in Japan [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1998, 64: 116-120.
- [16] ALBUQUERQUE L C, INOUE-NAGATA A K, PINHEIRO B, et al. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil[J]. Archives of Virology, 2011, 156(7):1291-1294.
- [17] PARDINA P R, LUQUE A, NOME C, et al. First report of sweet potato leaf curl virus infecting sweet potato in Argentina[J]. Australasian Plant Disease, 2012, 7:157-160.
- [18] LUAN Y S, ZHANG J. First report of sweetpotato leaf curl virus on China[J]. Plant Disease, 2006, 90(8):1111.
- [19] LOTRAKUL P, VALVERDE R A, CLARK C A, et al. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States[J]. Plant Disease, 1998, 82: 1253-1257.
- [20] LI R H, SALIH S, HURTT S. Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2004, 88:1347-1351.
- [21] SAMBROOK J, RUSSEL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京: 科学出版社, 2002: 492-509.
- [22] BI H P, ZHANG P. Molecular characterization of two sweepoviruses from China and evaluation of the infectivity of cloned SPLCV-JS in *Nicotiana benthamiana* [J]. Archives of Virology, 2012, 157: 441-454.
- [23] ALVIN M S, KAI-SHU L, HOWARD F H, et al. Sweet potato leaf curl virus: efficiency of acquisition, retention and transmission by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. Crop Protection, 2009, 28:1007-1011.
- [24] ROOSSINCK M J. Plant virus evolution[M]. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, 2008:53-79.
- [25] ZHANG C L, GAO R, WANG J, et al. Molecular variability of tobacco vein banding mosaic virus population [J]. Virus Research, 2011, 158:188-198.

(责任编辑:张震林)