

张成玲, 徐 振, 孙厚俊, 等. 中国甘薯双生病毒 *C4* 基因分子变异及遗传多态性分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 487-492.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.002

中国甘薯双生病毒 *C4* 基因分子变异及遗传多态性分析

张成玲, 徐 振, 孙厚俊, 赵永强, 杨冬静, 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: 甘薯双生病毒是中国甘薯上一种重要的病毒,其 *C4* 基因编码的蛋白是一个多功能蛋白,参与了寄主症状的形成及病毒在植物体内移动等。本研究利用 PCR 方法扩增了 24 个分离物的 *C4* 基因,通过 SDT、DnaSP 等软件分析,结果表明,24 个分离物核苷酸序列均为 258 个碱基,一致率为 73.3%~100.0%,编码 85 个氨基酸,一致率为 47.1%~100.0%。中国甘薯双生病毒分离物 *C4* 基因构建系统进化树分为 2 个组,组 I 包括本研究的 15 个双生病毒分离物及中国大部分双生病毒分离物,又分为 2 个亚组,亚组 2 仅有 15 个双生病毒分离物,其中本研究的 6 个分离物位于此亚组;组 II 含有 30 个双生病毒分离物,包括本研究的 9 个分离物。非同义突变与同义突变比值大于 1,说明 *C4* 基因处于正向选择。亚组 1 错配分布图为单峰,说明该组种群呈突然暴发的状态,其余组或亚组为多峰锯齿状,表明种群或者亚种群已经存在很长时间,长期处于动态平衡。

关键词: 甘薯双生病毒; *C4* 基因; 分子变异; 遗传多态性

中图分类号: S435.311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0487-06

Molecular variation and genetic polymorphism of *C4* gene in sweepoviruses of China

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

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai Area/Key laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweet potato, Ministry of Agriculture, Xuzhou 221131, China)

Abstract: The multi-functional protein encoded by *C4* gene of sweepovirus is involved in the host symptoms formation and the virus movement. To characterize the *C4* gene infecting *Ipomoea batatas* in China, the gene fragments of 24 isolates from sweet potato were amplified by PCR and analyzed by SDT, DnaSP and so on. The nucleotide sequences and amino acid sequences of the 24 isolates shared similarities of 73.3%–100.0% and 47.1%–100.0%, respectively, containing 258 base pairs and 85 amino acids. Phylogenetic trees constructed based on *C4* gene revealed that the isolates were divided into two groups. Group I included most of the isolates collected from China and 15 isolates in this study, and was divided into two subgroups. Group II included 21 isolates from Genbank and 9 isolates in this study. The ratio of nonsynonymous mutation to synonymous mutation (d_N/d_S ratio) of *C4* gene was 1.53, indicating that *C4* gene was under positive selection. The mismatch distribution of sweepoviruses for all groups and subgroups except subgroup 1 shaped multimodal and jagged, suggesting that the population/subpopulations were long-existing.

收稿日期: 2016-11-21

基金项目: 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); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(13)5080]

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

Key words: sweepovirus; *C4* gene; molecular variation; genetic polymorphism

甘薯双生病毒 (Sweetpotavirus) 是甘薯上一种重要的病毒之一,在全球多个国家甘薯种植区发生及

危害^[1-3],也是近几年中国甘薯上危害严重的病毒之一^[4]。感染该类病毒的甘薯表现叶片上卷、叶片叶脉黄化、植株矮化等症状,造成的甘薯产量损失约为 20%~80%^[4-5]。据 2015 年 ICTV 网站上公布的病毒种名目录,侵染甘薯的双生病毒共有 11 个种及多个暂定种^[6],而中国发现了 6 种双生病毒,分别是甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl virus,SPLCV)、中国甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl China virus,SPLCCNV)、河南甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl Henan virus,SPLCHnV)、四川甘薯卷叶病毒 1(Sweet potato leaf curl Sichuan virus1,SPLCSV1)、四川甘薯卷叶病毒 2(Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2,SPLCSV2)及乔治亚甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl Georgia virus,SPLCGoV)。

绝大多数甘薯双生病毒只发现了 DNA-A 组分,大小约为 2.8 kb,由烟粉虱以持久方式传播^[7]。Sweetpovirus 基因组编码 6 个开放阅读框架(ORF),病毒链上 2 个,分别为 V1 和 V2,互补链上 4 个,分别为 C1、C2、C3 和 C4。C4 编码的蛋白位于植物细胞质膜、表皮细胞及细胞核内^[8]。研究表明,单组分双生病毒 C4 蛋白是个多功能蛋白,参与了植物卷叶、黄化等症状的形成^[9],与病毒在植物体内移动有关^[9-10],作为沉默抑制子参与转录后基因沉默^[11-13]等。

双生病毒的遗传变异主要通过突变(Mutation),重组(Recombination)及假重组(Pseudorecombination)等方式产生。其中重组及突变是驱动双生病毒遗传多样性及形成新种群的重要机制^[14-16]。Albuquerque 等^[14]分析了巴西甘薯双生病毒遗传多样性及重组,结果表明,甘薯双生病毒通过重组产生适应性更强的新的病毒种类或株系,并且,甘薯双生病毒的重组热点是在基因间隔区(The intergenic region,IR)和 C1 开放阅读框中间区域。Zhang 等^[17]对甘薯双生病毒重组分析发现,SPLCV 有 2 个重组热点,分别在复制起始点和 C2/C4 之间。张成玲等分析 SPLCV V1 遗传多样性的结果表明,突变在 SPLCV 中普遍存在^[15]。由于中国甘薯双生病毒遗传变异研究较少,尤其是单个功能基因如 C4 基因的变异研究较少,缺乏相应的遗传多样性分析数据,有关中国甘薯双生病毒具体分布及变异情况还不清楚。本研究利用 PCR 扩增了中国双生病毒分离物的 C4 基因序列,

针对中国甘薯上双生病毒的发生,通过一系列分子生物学软件,分析了中国双生病毒 C4 基因分子变异及遗传多态性,为有效地防治病毒及抗病遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

2013-2015 年从江苏徐州甘薯中心品种资源库及育苗床随机采集甘薯苗样品,采集的样品主要表现为叶片上卷、黄化、植株矮化等症状。将样品编号后,分别称取 0.1 g 叶片组织放到 2 ml 灭菌离心管中,每个样品 2~3 份,-80 ℃冰箱保存备用。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 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.2 PCR 扩增及序列测定

根据 GenBank 登录的序列及参考 Li 等^[18]设计引物,PW285-1:5'-TAATTCGAAGTGCAGTTC-CGTATTTACAGTT-3'和 PW285-2:5'-GCTAGAG-GAGGCCTGCAGACTGCTAACGACG-3',获得序列后,根据序列信息,设计扩增甘薯双生病毒接近全长基因序列的特异引物对,LCVF:5'-CATGACATTTTCAGCGGCCAGTC-3'和 LCVR:5'-GAC-CCATATCCATTGTTATTG-3'。由生工生物(上海)有限公司合成。利用 DNA 提取试剂盒提取甘薯样品总 DNA,以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,分离回收目的片段,并连接到 pMD18-T 载体中,转化到大肠杆菌感受态细胞中,经蓝白斑筛选后提取质粒并进行 PCR 鉴定^[19],阳性克隆送交生工生物(上海)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,确定其核苷酸序列。

1.3 数据处理

将获得的序列在 NCBI 上进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),根据比对结果下载相关序列,利用 SDT(<http://web.cbio.uct.ac.za/~brejnev/>)软件进行序列比对,采用 MEGA6.0 软件(<http://www.megasoftware.net>)中的最大简约法(Maximum likelihood,ML)和邻接法(Neighbour-joining,NJ)构建系统进化树,采用 RDP3(包含 7 个软件,分别是

RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MAXCHI、CHIMAE-RA、3SEQ 及 SISCAN) 进行重组分析,采用 DnaSP 软件及综合最大似然法(Composite maximum-likelihood, CML)^[20-21] 进行多态性及选择压力分析,根据 ω 值[非同义突变(d_N)和同义突变(d_S)的比率, d_N/d_S]与 1 的大小判断选择方向,显著性差异时, $\omega > 1$,说明为正向(多样性)选择,反之, $\omega < 1$,为负向(纯化)选择, $\omega = 1$,为中性选择。

2 结果与分析

2.1 甘薯双生病毒 C4 基因的扩增及序列分析

采集到的样品,经 PCR 扩增后共获得 24 个分离物,其 C4 基因核苷酸长度均为 258 bp,编码 85 个氨基酸。利用 SDT 及 DNAMAN 软件进行核苷酸两两比对后,24 个分离物的核苷酸一致率为 73.3%~100.0%;氨基酸一致率为 47.1%~100.0%。其中, XU8_3 与 XU8_2、XU11_2 与 XU12_2 等核苷酸和氨基酸一致率最高,均为 100.0%, XU1_3 与 XU8_3、XU3_18 等核苷酸和氨基酸一致率最低,分别为 73.3%和 47.1%(图 1)。

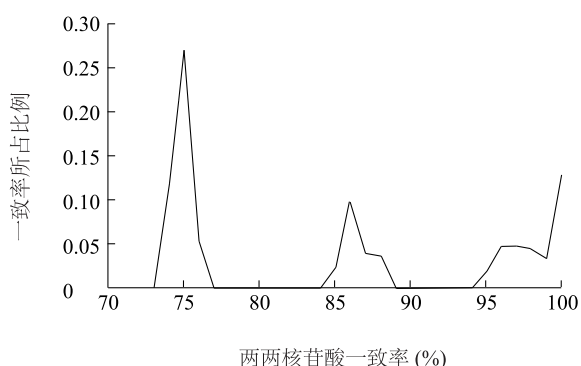


图 1 24 个分离物核苷酸两两比对结果

Fig.1 Similarities of the nucleotide sequence of 24 sweepoviruses

C4 氨基酸一致率相对较低,85 位氨基酸仅有 2 个保守基序,分别位于中间位置 39~44 位的 SRELNP 及 C 末端 66~76 位的 STADLLEEVSR。所有的核苷酸变异均是碱基置换,不存在碱基插入/缺失现象。有 48 个突变位点,占总位点的 56.54%,均为简约信息位点(Parsimony informative sites)。

2.2 中国甘薯双生病毒 C4 基因系统进化分析

将 NCBI 上登录及本研究获得的共 91 个中国甘薯双生病毒分离物的 C4 基因,利用 RDP 软件分析其重组,结果表明,C4 基因上未发现明确重组。以木薯

花叶病毒(African cassava mosaic virus, ACMV) C4 基因为外围,利用 MEGA6 软件 NJ 及 ML 法构建系统进化树。结果(图 2)表明,中国甘薯双生病毒分离物 C4 基因分为 2 个组(组 I 和组 II),其中组 I 分离物包括中国大部分甘薯双生病毒分离物,本研究有 15 个甘薯双生病毒分离物位于此组中。组 I 又分为了 2 个亚组(亚组 1 和亚组 2),其中亚组 1 主要包括 SPLCV 及本研究的 9 个甘薯双生病毒分离物,而亚组 2 包含包括 SPLCHnV 及 SPLCCNV 分离物,且这 2 个种的甘薯双生病毒分离物均单独聚为一簇,本研究 XU13_1、XU1_3、XU5_3、XU3_17、XU12_4、XU9_1 分离物单独聚为一簇,位于该组中。组 II 含有 30 个分离物,分别为 SPLCHnV、SPLCSV 等种及上海甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl Shanghai virus, SPLCShV)、广西甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl Guangxi virus, SPLCGxV)等暂定种。本研究的 XU8_2 与 XU8_3 跟 KJ013581 等 SPLCShV 分离物聚为一簇,其余分离物与 KJ476508 等 SPLCGxV 分离物聚为一簇。

2.3 中国甘薯双生病毒分离物种群多态性分析

为了明确中国甘薯双生病毒分离物 C4 基因的变异和所承受选择压力的情况,我们计算了 ω 值。结果表明,该基因 d_N 和 d_S 分别为 0.227 和 0.148, d_N/d_S 为 1.53,大于 1,说明该基因处于多样化选择,即正向选择,基因所承受的选择压力大。

分析中国甘薯双生病毒分离物 C4 基因的错配分布,结果表明,C4 组及亚组分离物错配分布图为多峰锯齿状(图 3a、图 3b、图 3d),表明种群或者亚种群已经存在很长时间,并非新出现的谱系,种群长时间处于一个动态平衡,为低频率的多态性。但亚组 1,为甘薯卷叶病毒分离物,分布图相对比较平滑,有一个单峰说明该组的甘薯双生病毒种群呈突然暴发的状态(图 3c)。

中性检测结果表明,亚组 1 的 $Tajima's D$ 、 $Fu & Li's D$ 和 $Fu & Li's F$ 均为负值(表 1),说明种群或亚种群处于扩张趋势。组 II 及亚组 2 分离物的 $Tajima's D$ 、 $Fu & Li's D$ 和 $Fu & Li's F$ 值为正值,说明种群可能处于一个收缩状态或者选择平衡状态,但是 P 值均大于 0.10,因此结论不肯定。所有组和亚组的单倍体标本多样性为 0.90 以上,除组 II 核苷酸多样性达到 0.1,其余组及亚组核苷酸多样性值低,但是不同的组或亚组之间的核苷酸多样性值不同(表 1)。

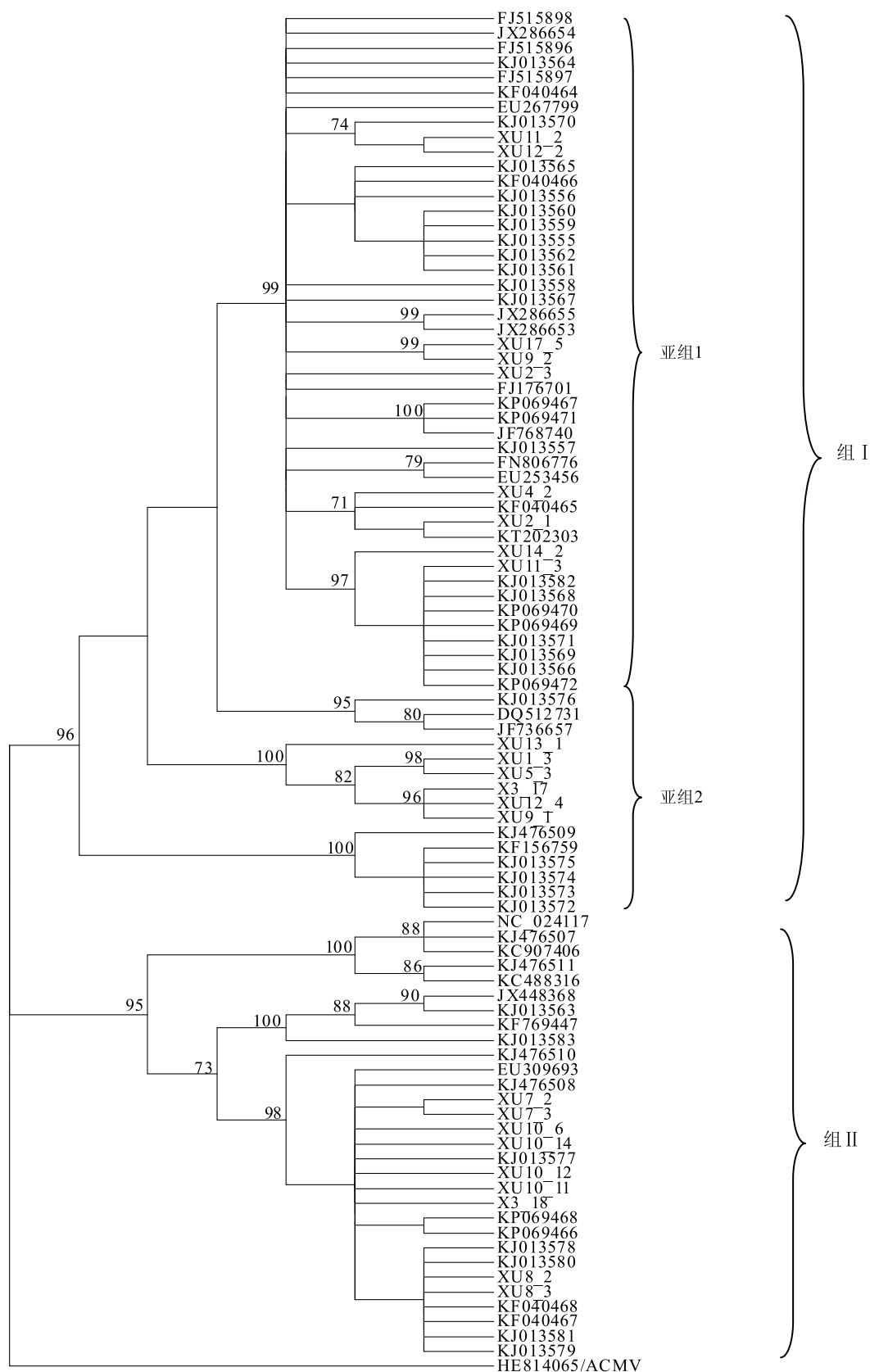
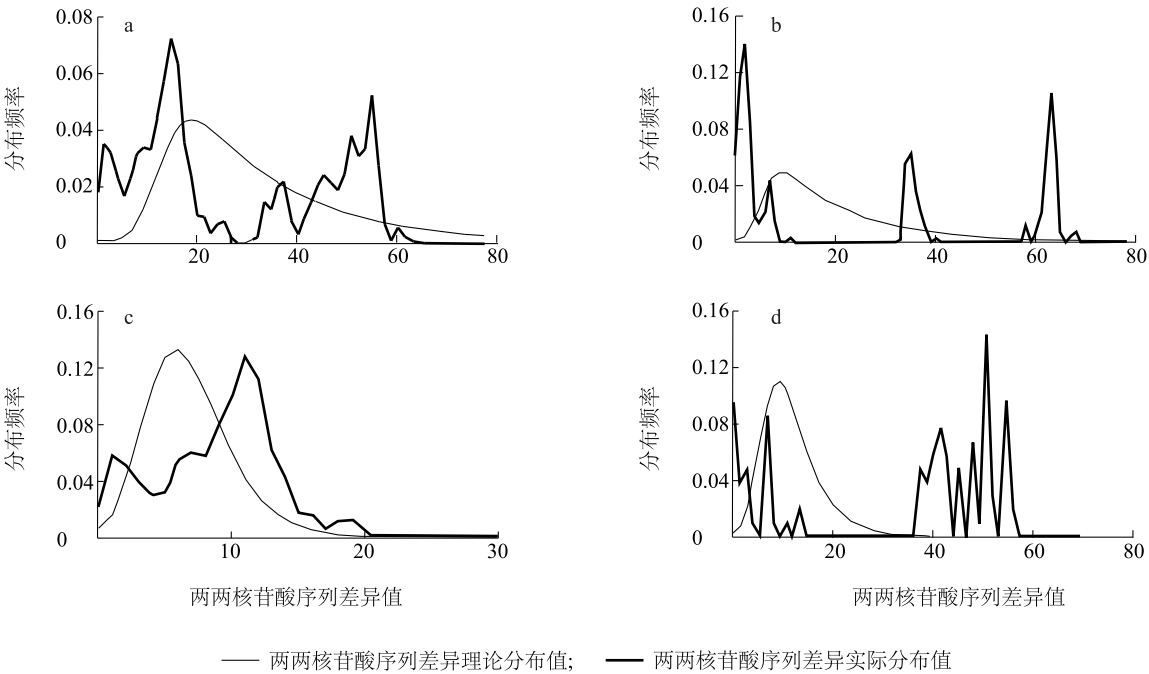


图 2 中国甘薯双生病毒分离物 C4 基因系统进化树及其分组

Fig.2 Phylogenetic analysis of C4 gene of sweepviruses in China



a:组 I ; b:组 II ;c:亚组 1;d:亚组 2。

图 3 甘薯双生病毒组或亚组中分离物核苷酸序列错配分布图

Fig.3 The frequency distribution of the nucleotide sequence mismatches for groups or subgroups of sweepovirus isolates from China

表 1 中国甘薯双生病毒种群的中性检测,单倍体标本和核苷酸多样性检测

Table 1 Neutrality tests, haplotype and nucleotide diversity of each population of sweepoviruses

组/亚组	<i>Tajima's D</i>	<i>Fu & Li's D</i>	<i>Fu & Li's F</i>	单倍体标本多样性	核苷酸多样性
组 I	-0.261 01	0.696 42	0.389 13	0.982±0.007	0.077 36±0.007 84
亚组 1	-0.837 65	-0.517 74	-0.753 52	0.978±0.011	0.034 20±0.002 25
亚组 2	1.231 28	1.114 93	1.322 43	0.905±0.054	0.096 42±0.006 84
组 II	0.037 98	0.988 88	0.794 43	0.938±0.027	0.101 77±0.019 64

3 讨论

本研究主要采集表现卷叶及黄化症状的样品,检测甘薯双生病毒阳性率为 100%。通过 PCR 扩增获得了 24 个双生病毒分离物的 C4 基因序列,两两核苷酸一致率分析结果表明,24 个分离物核苷酸和氨基酸序列变异较大,一致率不高,尤其是 XU1_3 与 XU8_3 等分离物一致率低,氨基酸一致率在 50% 以下。其氨基酸的一致率低可能与其功能有关,该基因与症状的形成有关^[22],基因的突变与引起症状轻重及症状的不同有关,需进一步的功能试验验证这一观点。中国甘薯双生病毒分离物构建的系统进化树分为 2 个组,组 I 又分为了 2 个亚组,包含中国

大部分双生病毒分离物及本研究的 15 个双生病毒分离物,这些分离物主要是 SPLCV,还有 SPLCHnV 及 SPLCCNV 等种类。而组 II 包括的种及暂定种类较多,其中 SPLCHnV 部分分离物也位于此组中。可能由于 C4 基因变异大,氨基酸及核苷酸突变率高,因此同一个种不一定分到同一个组中。

重组及突变分析结果表明,中国甘薯双生病毒的 C4 基因并未发生重组,而突变才是引起 C4 基因分子变异的主要原因,并且大部分核苷酸的突变引起了氨基酸的改变,即非同义突变大于同义突变, d_N/d_S 大于 1,基因所承受的选择压力大,处于正向(多样化)选择。

甘薯双生病毒单独发生引起的田间症状不明

显,并且随气温的升高,出现隐症现象,在田间容易被忽视,因此,此类病毒在中国报道的发生时间较晚^[23]。尽管中国甘薯双生病毒种类较多,但是由于目前部分双生病毒种类分离物数量不多,因此本研究利用构建的系统进化树分组分析了C4基因错配分布及中性检测,结果表明,中国甘薯双生病毒并非新出现的种群,而是已经存在很长时间了,并且处于动态平衡,只有亚组1种群处于突然暴发状态。通过本研究的分子变异及多态性分析,明确了C4基因的变异机制,对抗病品种的选育和病害的有效防治提供了理论依据。

参考文献:

- [1] BRIDDON R W, BULL S E, BEDFORD I D. Occurrence of *Sweet potato leaf curl virus* in Sicily[J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(2):286.
- [2] OSAKI T, INOUE T. Transmission characteristics and cytopathology of a whitefly-transmitted virus isolated from sweet potato leaf curl disease[J]. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture, ser. b Agriculture & Biology*, 1991, 43:11-19.
- [3] 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(1):157-160.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] ADAMS M J, LEFKOWITZ E J, KING A M Q, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(7):1837-1850.
- [7] 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.
- [8] 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(3):441-454.
- [9] TENG K, CHEN H, LAI J, et al. Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (Family Geminiviridae) in virus movement[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6):11280-11287.
- [10] HAK H, LEVY Y, CHANDRAN S A, et al. TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein[J]. *Virology*, 2015, 477:56-60.
- [11] LUNA A P, MORILLA G, VOINET O, et al. Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(10):1294-1306.
- [12] SINGH A, TANEJA J, DASGUPTA I, et al. Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA[J]. *Molecular Plant pathology*, 2015, 16(7):724-734.
- [13] FUENTES A, CARLOS N, RUIZ Y, et al. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(3):197-209.
- [14] ALBUQUERQUE L C, INOUE-NAGATA A K, PINHEIRO B, et al. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil[J]. *Virology Journal*, 2012, 9(1):241-253.
- [15] 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.
- [16] LOZANO G, TRENADO H P, VALVERDE R A, et al. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications [J]. *The Journal of General Virology*, 2009, 90(10):2550-2562.
- [17] ZHANG S C, LING K S. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between sweet potato leaf curl virus and sweet potato leaf curl Georgia virus[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(6):955-968.
- [18] LI R H, SALIH S, HURTT S. Detection of geminiviruses in sweet potato by polymerase chain reaction[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(12):1347-1351.
- [19] SAMBROOK J, RUSSEL D W. 分子克隆实验指南(上、下册)[M]. 3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002:492-509.
- [20] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [21] ROZAS J, SANCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18):2496-2497.
- [22] PARK J, HWANG H S, BUCK K J, et al. C4 protein of Beet severe curly top virus is a pathomorphogenetic factor in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(12):1377-1389.
- [23] 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(2):379-385.

(责任编辑:陈海霞)