

柑橘碎叶病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析

宋震, 刘科宏, 杨方云, 唐科志, 李中安, 周常勇

(西南大学柑橘研究所/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要: 【目的】了解中国 CTLV 分离物外壳蛋白 (CP) 基因的变异情况。【方法】对来源于中国不同地区、不同寄主品种的 18 个柑橘碎叶病毒 (CTLV) 分离物进行 RT-PCR、克隆、测序, 应用 DNAMAN 软件进行序列分析。【结果】18 个分离物的 CP 基因全长 714 nt, 推导的 CP 含 237 个氨基酸。CP 核苷酸序列及推导的氨基酸序列最大相似性分别为 88.5% ~ 99.9% 和 91.1% ~ 99.6%。与核苷酸序列 $G^{289} \rightarrow A$ 或 C , $A^{409} \rightarrow C$ 和 $G^{414} \rightarrow T$ 的单碱基突变相对应, CTLV 外壳蛋白第 97、137、138 位氨基酸在强、弱毒分离物之间存在差异, 多数弱毒分离物为 Q^{97} 或 K^{97} 、 Q^{137} 、 H^{138} , 而多数强毒分离物为 E^{97} 、 R^{137} 或 K^{137} 、 Q^{138} 。在根据 CP 氨基酸序列构建的系统进化树上, 本研究获得的 18 个 CTLV 分离物至少可以划分为 2 个组群, 其中, 在指示植物上表现较弱症状的多数 (4/6) CTLV 分离物划分在第 I 组群, 多数 (10/12) CTLV 强毒分离物划分在第 II 组群。【结论】CTLV 外壳蛋白基因相对保守, 其第 289、409、414 位碱基在强、弱毒分离物之间存在差异, 可能与病毒致病性相关。

关键词: 柑橘碎叶病毒; CTLV; 外壳蛋白基因; 克隆; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the CP Gene of *Citrus tatter leaf virus*

SONG Zhen, LIU Ke-hong, YANG Fang-yun, TANG Ke-zhi, LI Zhong-an, ZHOU Chang-yong

(Citrus Research Institute of Southwest University, Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712)

Abstract: 【Objective】 This study was conducted to investigate the molecular variability of the coat protein (CP) gene of *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) isolates collected from China. 【Method】 The CP gene of 18 CTLV isolates from different geographical origins and citrus varieties were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The DNA products were cloned and sequenced, and sequence analysis was conducted by DNAMAN. 【Result】 The CP gene of 18 CTLV isolates were all 714 nucleotides in length, and the putative CP contained 237 amino acids (aa). The identities of nucleotide and deduced amino acid sequences of CP gene among 18 isolates ranged from 88.5% to 99.9% and 91.1% to 99.6%, respectively. Corresponding to the mutation $G^{289} \rightarrow A$ or C , $A^{409} \rightarrow C$, and $G^{414} \rightarrow T$ on nucleotide sequences of CP gene, amino acids at positions 97, 137, and 138 of CP were different between isolates expressing mild symptoms and isolates expressing severe symptoms in the indicators. Q^{97} or K^{97} , Q^{137} , H^{138} were discovered in most mild isolates, whereas E^{97} , R^{137} or K^{137} , Q^{138} were shared by most severe isolates. Phylogenetic trees based on the aa sequences of the coat proteins showed that 18 CTLV isolates were divided into two clusters, and most of the mild isolates (4/6) belonged to the I group and most severe isolates (10/12) belonged to the II group. 【Conclusion】 The CP gene of CTLV was relatively conserved. The differences between mild and severe strains are very subtle, with three nucleotide positions (289, 409 and 414) appearing to determine the pathogenicity of virus.

Key words: *Citrus tatter leaf virus*; CP gene; cloning; sequencing

收稿日期: 2009-01-12; 接受日期: 2009-06-01

基金项目: 重庆市科技攻关项目 (CSTC, 2007AA1024)、国家科技支撑计划 (2007BAD61B04)

作者简介: 宋震 (1973-), 男, 河北磁县人, 助理研究员, 研究方向为植物病毒类病害。E-mail: songzhen168@163.com。通信作者周常勇 (1965-), 男, 湖南安仁人, 研究员, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: changyong@hotmail.com。通信作者李中安 (1965-), 男, 重庆奉节人, 副教授, 研究方向为分子遗传学。E-mail: zhongan369@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*, CTLV) 引起的柑橘碎叶病是威胁柑橘生产的重要病害之一。美国、南非、澳大利亚、日本等地均有该病发生的报道^[1-3]。CTLV 在中国多数柑橘产区均有分布, 浙江、湖南、福建和广西等省(区)的局部地区 CTLV 已造成比较严重的危害^[4-7]。了解中国 CTLV 的变异情况, 对该病的防控及风险预警具有现实意义。【前人研究进展】CTLV 是线性病毒科 (Closteroviridae) 发状病毒属 (*Capillovirus*) 的正义单链 RNA 病毒^[8]。由于形态学、血清学以及分子生物学特性上的密切关系, CTLV 被认为与苹果茎沟病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV) 是同一种病毒的不同株系^[9]。CTLV 病毒粒子呈弯曲线状, 大小为 600~700 nm×15 nm, CTLV 的基因组全长 6 496 nt, 5'端具帽子结构, 3'端具 Poly (A) 尾巴, 包含两个重叠的开放阅读框: ORF1 (6.3 kb) 和 ORF2 (1.0 kb), 其中 ORF1 编码一个分子量为 241 kD 的多聚蛋白, 外壳蛋白 (CP) 位于其 C 端, 大小约为 27 kD^[10-12]。目前, 已经测定了来源于百合的 L^[10]和 Li-23^[11]以及来自苹果的 P209^[12]等分离株的全基因组序列, 这些分离株间 CP 基因核苷酸序列相似性 92.8%~99.7%。近年来, 中国报道了一些来自苹果、梨的 ASGV (CTLV)CP 基因核苷酸序列, 它们的最大相似性为 88.5%~98%, 表明其 CP 变异相对较大^[13-14]。目前, 针对中国柑橘 CTLV 分离物进行外壳蛋白变异的研究尚无报道。【本研究切入点】考虑到 CP 在病毒致病性中的可能作用, 以及单碱基突变可能改变病毒致病性的现象^[15-23], 作者对中国不同地区、不同寄主品种的 18 个 CTLV 分离物进行 CP 基因的克隆、序列测定和分析。【拟解决的关键问题】了解中国 CTLV 的 CP 基因变异情况, 探讨与病毒致病性相关的基因位点。

1 材料与方法

1.1 病毒分离物及其指示植物鉴定

CTLV 分离物保存于中国农业科学院柑桔研究所网室内, 其原寄主品种、来源地见表。2007 年 3 月, 嫁接接种供试分离物于粗柠檬砧腊斯克枳橙, 每个分离物 5 株重复, 并设健康植株对照进行指示植物鉴定。于当年和来年 4—5 月观察记录腊斯克枳发病情况, 参照何新华等^[24]的病情分级标准综合评价各分离物的致病力。

1.2 RT-PCR 反应体系

按照周常勇等^[25]的方法提取样品总核酸, 应用一步法 RT-PCR 进行 CTLV 的 cDNA 合成。所用引物根据已知 CTLV 序列的保守区域设计, CTLVF: 5'-CCCTCTCAGCTAGAATTGAA-3', CTLVR 5'-AGAGTGGACAAACTCTAGAC-3'分别与分离株 CTLV-L (GenBank 登录号 D16681) 的第 5 607—5 626 和 6 477—6 496 位碱基相对应。RT-PCR 反应体系为: 2×PCR 缓冲液 5 μl, 10 μmol·L⁻¹ 引物各 1.25 μl, 50 mmol·L⁻¹ MgSO₄ 0.3 μl, RT/Taq 酶 (Invitrogen 公司) 1 U, 模板总核酸 1 μl, 超纯水 1.5 μl。扩增条件为: 42℃, 30 min; 94℃, 2 min; 94℃ 20 s, 54.5℃ 20 s, 72℃ 45 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。一步法 RT-PCR 反应结束后取 1 μl 作模板, 扩大反应体系按相同条件进一步扩增。50 μl 反应体系含: 超纯水 37.9 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl, 50 mmol·L⁻¹ MgSO₄ 1.6 μl, 10 μmol·L⁻¹ dNTP 1 μl, 10 μmol·L⁻¹ 引物各 1.5 μl, Taq 酶 2.5 U。

1.3 克隆测序及序列分析

PCR 反应产物经切胶回收、纯化后与 pMT18-T Vector (TaKaRa 公司) 连接, 随后转化大肠杆菌 DH5α, 经蓝白斑筛选、PCR 及酶切鉴定获得阳性单克隆。阳性单克隆菌液送上海尚博生物技术有限公司进行正反向链双向测序, 对目标片段内正反向序列完全吻合的序列加以采用, 否则重新测序。利用 DNAMAN6.0.40 对所测序列以及在 GenBank 中登录外壳蛋白基因全序列的 13 个 CTLV (ASGV) 分离物进行序列比对等分析, 并用最大相似法构建系统进化树。上述分离物的 GenBank 登录号(株系, 寄主, 来源地)分别为: AY646511 (CTLV-Kumquat 1, 金橘, 台湾)、DQ273564 (CTLV-Shatangju, 砂糖橘, 广东)、DQ831492 (CTLV-NH, 脐橙, 湖南)、D16681 (CTLV-L, 百合, 日本)、D16368 (CTLV, 日本)、D14455 (CTLV, 日本)、NC001749 (ASGV-P-209, 苹果, 日本)、AY886760 (ASGV-Kuerle's pear, 梨, 新疆)、AF522459 (ASGV-Kiwi fruit, 猕猴桃, 中国)、AB004063 (ASGV-Li-23, 百合, 日本)、AF438409 (ASGV-UV01, 苹果, 巴西)、EU236258 (ASGV-YL06, 苹果, 陕西)、D14995 (ASGV, 日本)。

2 结果与分析

2.1 CTLV 分离物的指示植物鉴定

除健康植株对照没有症状外, 18 个 CTLV 分离物在指示植物上均表现出不同程度的叶片黄斑、扭曲,

表 18 个 CTLV 分离物的指示植物鉴定结果

Table Summary of biological indexing of 18 CTLV isolates

| 分离物 Isolates | 寄主品种 Host | 来源地 Location | 腊斯克枳橙症状 Symptoms on Rusk Citrange |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| QYPG | 黔阳椪柑 Qianyang Ponkan | 湖南 Hu'nan | +++ |
| SXH | 山下红 Yamasitabeniwase unshu | 四川 Sichuan | +++ |
| BDZ | 少核本地早 Seed less Bendizao mandarin | 浙江 Zhejiang | +++ |
| LH | 丽红 Reikou | 四川 Sichuan | +++ |
| WZMG | 温州蜜柑 Satsuma mandarin | 广西 Guangxi | +++ |
| LC | 梨橙 Licheng sweet orange | 重庆 Chongqing | +++ |
| DYDG | 大叶大果 Jincheng sweet orange | 重庆 Chongqing | +++ |
| CXT | 脆香甜 Cuixiangtian pummelo | 四川 Sichuan | +++ |
| XZX | 西之香 Nishinokaori | 湖南 Hu'nan | +++ |
| YHC | 渝红橙 Yuhongcheng sweet orange | 重庆 Chongqing | +++ |
| QC4 | 4 号脐橙 Navel orange No.4 | 中柑所 CRI | +++ |
| HH1 | 华红 1 号 Navel orange Huahong No.1 | 湖北 Hubei | +++ |
| BJNM | 北京柠檬 Beijing lemon | 中柑所 CRI | ++ |
| XHC | 新会橙 Xinhuiheng sweet orange | 中柑所 CRI | ++ |
| XLB | 星露比 Star Ruby grapefruit | 台湾 Taiwan | + |
| JG | 蕉柑 Tankan | 中柑所 CRI | + |
| YYG | 艳阳柑 Sunburst | 台湾 Taiwan | + |
| GB | 广 B Guang-B sweet orange | 广西 Guangxi | + |

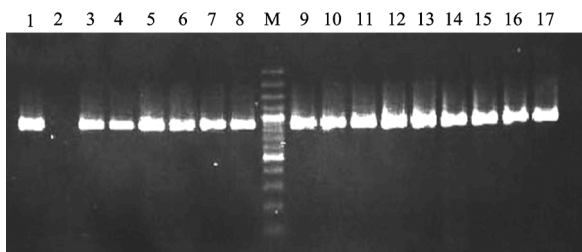
“+、++、+++” 分别表示腊斯克枳橙植株矮化, 叶片黄斑、扭曲, 叶缘缺损等症状的“轻微、中等、严重”

“+, ++, +++” indicate mild, moderate, severe symptoms on Rusk Citrange of leaflet distortion, chlorotic patches, plant stunted. “CRI” indicate Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences

叶缘缺损等碎叶病症状, 结果见表。来自艳阳柑、广 B、蕉柑、新会橙、北京柠檬, 星露比葡萄柚的 CTLV 分离物致病力较弱, 其它分离物致病力较强。

2.2 RT-PCR 产物分析

使用引物对 CTLV F 及 CTLV R 对 18 个 CTLV 分离物进行了 RT-PCR, 经电泳观察, 其扩增条带约为 889 bp, 与预期大小相符 (图 1)。



1: 正对照; 2: 负对照; 3~17: CTLV 分离株; M: 100 bp 梯度 DNA 标准分子量

1: Positive control; 2: Negative control; 3-17: CTLV isolates; M: DNA marker with 100 bp ladders

图 1 CTLV 的 RT-PCR 检测

Fig. 1 RT-PCR detection of CTLV

2.3 CTLV 外壳蛋白基因克隆及核苷酸序列分析

对来源于不同地区、不同寄主品种的 18 个 CTLV 分离物进行了克隆、序列测定和分析。结果表明, 目标克隆片段长度均为 889 bp, 包含了 CP 基因的全长核苷酸序列。18 个 CTLV 分离物的 CP 基因 (GenBank 登录号为: FJ223203~FJ223220) 均为 714 个核苷酸, 不存在缺失、插入现象, 编码框起始于 AUG 终止于 UAG。

序列分析结果表明, 18 个 CTLV 分离物 CP 基因相似性在 88.5%~99.9%, 来源于黔阳椪柑的 QYPG 和来源于梨橙的 LC 相似性最低, 来源于渝红橙的 YHC 和来源于北京柠檬的 BJNM 相似性最高。来自重庆的 3 个分离物 LC、DYDG、YHC 之间相似性为 90.6%~99.4%, 四川的 3 个分离物 LH、CXT、SXH 之间相似性为 92.5%~95.4%, 而湖南的 QYPG、XZX 间相似性为 88.9%。这表明 CTLV 分离物的核苷酸序列相似性与其来源地域、寄主品种没有直接相关关系。

对所获得的 18 个 CTLV 分离物与 GenBank 中的 6 个 CTLV 分离物和 7 个 ASGV 分离物的 CP 基因进行了序列分析, 31 个 CP 核苷酸序列相似性为 88%~

100%。其中，来自日本的分离物 NC001749 (P-209) 与 D14995、D14455 与 D16681 (L)、D16368 与 AB004063 (Li-23) 之间的相似性均分别为 100%，而来自中国黔阳椪柑 QYPG 与源于中国苹果的分离物 EU236258 (YL06) 相似性最低为 88%。

2.4 CTLV 外壳蛋白氨基酸序列分析

根据 18 个 CTLV 分离物核苷酸序列推导的 CP 氨基酸序列见图 2，其全长 237 个氨基酸，推测外壳蛋白的分子量约为 27 kD。CP 氨基酸序列分析显示，CTLV 外壳蛋白第 97、137、138 位氨基酸在不同生物学性状的分离物之间存在差异，在指示植物上表现较弱症状的 YYG、GB、JG、XHC 等 CTLV 分离物为

| | | |
|------|--|-----|
| JG | MSLEDVLQARRHRVGVYLWKTHIDPAKELLVPPPEGFKEGESFGGRELyllLCNHYCKYLFGNIAVFGSSDKTQFP | 80 |
| GB | -----y-----m-----a----- | 80 |
| YYG | -----i-d-----k----- | 80 |
| XHC | -----e----- | 80 |
| XZX | -----y-----m-----a-----v----- | 80 |
| BJNM | -----y-----d-----e-k----- | 80 |
| XLB | -----p-----s-----d-----i----- | 80 |
| QC4 | -----m-----e----- | 80 |
| BDZ | -----g-----dn-----e----- | 80 |
| CXT | -----ed-----h-----p----- | 80 |
| DYDG | -----y-----d-----e-k----- | 80 |
| HH1 | -----g-----e----- | 80 |
| LH | -----g-i-----es----- | 80 |
| QYPG | -----s-----dd-----i----- | 80 |
| SXH | -----y-----d-----e-k----- | 80 |
| WZM | -----m-----d-----e----- | 80 |
| YHC | -----y-----d-----e-k----- | 80 |
| LC | -----lr-v-----es----- | 80 |
| JG | GFDTPPVHYSLTTTPKKGETEEKKAREGSSGEKTKIWRIDLNSVVPKLTFAATSQHNSLNECTFRKLCPEFADLAREF | 166 |
| GB | -----fn-----q-----k-----ev----- | 166 |
| YYG | -----fn-----q-----k-----ev----- | 166 |
| XHC | -----a-----a----- | 166 |
| XZX | -----fn-----q-----k-----ev----- | 166 |
| BJNM | -----n-----ee-----n-----v-----k-----rq----- | 166 |
| XLB | -----f-----s-----e-----dk-----v-----kq----- | 166 |
| QC4 | -----t-----er-----q-----kq----- | 166 |
| BDZ | -----n-----s-----e-----dk-----a-----i-----rq----- | 166 |
| CXT | -----t-----e-----k-----q-----rq----- | 166 |
| DYDG | -----n-----e-----s-----v-----k-----rq----- | 166 |
| HH1 | -----n-----s-----e-----kr-----i-----kq----- | 166 |
| LH | -----n-----ss-----ek-----q-----t-----i-----rq----- | 166 |
| QYPG | -----f-----s-----e-----dk-----v-----kq----- | 166 |
| SXH | -----n-----e-----n-----v-----k-----rq----- | 166 |
| WZM | -----t-----l-----e-----q-----rq----- | 166 |
| YHC | -----n-----ee-----n-----v-----k-----rq----- | 166 |
| LC | -----e-----v-----r----- | 166 |
| JG | LHERWSKGLATNIYKKWPKAFKSPWVAFDFATGLKMNRLTPDEKQVIDRMTKRLFRTEGGQKGVFEAGSESSLELEG | 237 |
| GB | -----e-----n----- | 237 |
| YYG | -----n----- | 237 |
| XHC | ----- | 237 |
| XZX | -----n----- | 237 |
| BJNM | -----n-----k----- | 237 |
| XLB | -----n----- | 237 |
| QC4 | -----p-----n----- | 237 |
| BDZ | -----n----- | 237 |
| CXT | -----n----- | 237 |
| DYDG | -----n----- | 237 |
| HH1 | ----- | 237 |
| LH | -----a-----n----- | 237 |
| QYPG | -----n----- | 237 |
| SXH | -----e-----n----- | 237 |
| WZM | -----n----- | 237 |
| YHC | -----n----- | 237 |
| LC | -----a-----n----- | 237 |

图 2 18 个 CTLV 分离物 CP 氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 2 Alignment of CP amino acid sequences of 18 CTLV isolates

Q⁹⁷ 或 K⁹⁷、Q¹³⁷、H¹³⁸，除 XZX、LC 外，在指示植物上表现较强症状的分离物为 E⁹⁷、R¹³⁷ 或 K¹³⁷、Q¹³⁸。上述差异均由单碱基突变所致，分别对应于核苷酸序列的 289 位 (G→A 或 C)、409 位 (A→C) 和 414 位 (G→T) 碱基。31 个序列多重比对分析表明，外壳蛋白氨基酸变异主要集中在 N 端 27—48 和 89—110 位氨基酸 2 个区域。另外，CP 氨基酸变异在 CTLV 分离物中相对丰富一些，出现在其中多个序列上的变异 H¹³→Y、A²⁷→G、T³²→M、E³⁷→D、Y⁸⁹→T、A¹⁰⁶→V、R¹¹⁹→K 是其它分离物所没有的。

对 31 个 CTLV (ASGV) 分离物进行了 CP 氨基酸序列的相似性分析，其结果显示与核苷酸序列相似性分析结果相近的变化趋势。本研究所获得的 18 个 CTLV 分离物的相似性 91.1%~99.6%，其中最大相似性仍然出现在 YHC 和 BJNM 之间，最小相似性出现在 LH 与 XZX 以及 LH 与 GB 之间。31 个氨基酸序列中，AB004063 (Li-23)、D16681 (L)、D16368 (Japan)、D14455 (Japan) 之间以及 D14995 (Japan)、NC001749 (P-209) 之间相似性 100%，来自中国的 CTLV 分离物 LH 和砂糖橘分离物 DQ273564 表现出最小的相似性 89.9%。

根据 31 个 CTLV (ASGV) 分离物 CP 氨基酸序列构建了系统进化树 (图 3)。在进化树上 31 个 CTLV

(ASGV) 分离物明显地分为 2 大组群。CTLV 分离物 LC、XHC、JG 与 DQ273564 (Shatangju)、AY646511 (Kumquat 1) 亲缘关系较近从而聚集成簇，并与另一簇 CTLV 分离物 YYG、GB、XZX 共同构成了一个组群，该组群包含了本研究所获得的 18 分离物中在指示植物上表现较弱症状的多数 (4/6) CTLV 分离物。CXT、WZMG、QC4 之间以及 CTLV 分离物 D14455 (Japan)、D16681 (L)、D16368 (Japan)、AB004063 (Li-23) 之间具有较近的亲缘关系，在系统进化树上分别聚集成簇，两者进一步聚集并与 ASGV 分离物聚集簇 NC001749 (P-209)、D14995 (Japan)、AF438809 (UV01) 和 EU236258 (YL06) 构成了进化树上的一大分支。QYPG、XLB、BDZ、HH1、LH 与 DQ831492 (NH)、AF522459 (Kiwi fruit) 之间同源性较强，占据了进化树上的另一分支。上两分支进一步聚合与 AY886760 (Kuerle pear) 共同构成了系统进化树的最大分支。BJNM、YHC、SXH、DYDG 作为独立的分支与上述分支进一步构成了进化树的一大组群。本研究所获得的 18 个 CTLV 分离物中，在指示植物上表现较强症状的多数 (10/12) 分离物划分在这一组群。

3 讨论

本文对来源于不同地区、不同寄主品种的 18 个

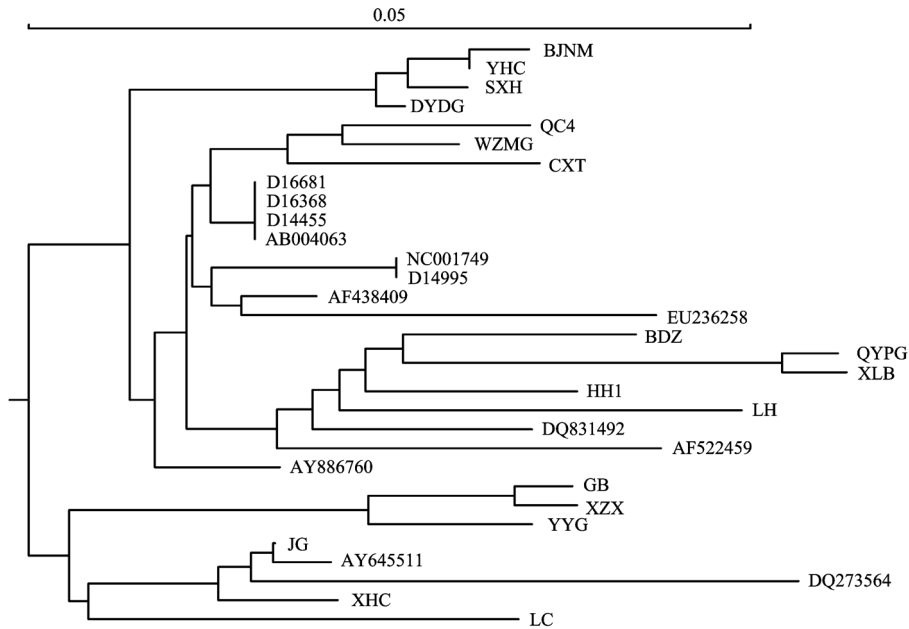


图 3 31 个 CTLV 外壳蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees of CP amino acid sequences of 31 CTLV isolates

CTLV 分离物进行了外壳蛋白 (CP) 基因的克隆、测序, 并与已登录 GenBank 的 6 个 CTLV 分离物和 7 个 ASGV 分离物的 CP 基因进行了序列相似性等分析。结果表明, 18 个分离物的 CP 基因全长均为 714 个核苷酸, 不存在缺失、插入现象, 序列相似性为 88.5%~99.9%。CP 基因推导的 CP 全长 237 个氨基酸, 序列相似性为 91.1%~99.6%。CTLV 的 CP 基因相对保守, 但也存在着不同程度的遗传变异, 而且这种变异与 CTLV 的来源地域、寄主品种没有直接相关关系, 与 Magome 等^[9]的报道结果相符。

植物病毒外壳蛋白基因往往与其致病性相关, 基因突变引起的少数 CP 氨基酸变异可以改变病毒的致病性, 导致寄主不同的症状。Takeshita 等^[15]研究发现, 黄瓜花叶病毒的 CP 与其在寄主内移动及过敏反应的诱发有关, Shintaku 等^[16]进一步指出, CP 上第 129 位氨基酸替换改变了黄瓜花叶病毒在烟草上的症状表现, 当 P¹²⁹突变为 L¹²⁹或 S¹²⁹时原来的绿色花叶症状取代之黄色褪绿症状。Dawson 等研究表明, 烟草花叶病毒 CP 基因与病毒在寄主内的移动及症状表现有关, 其第 6157 位碱基与寄主过敏性反应密切相关, 对病毒侵染林生烟具有关键作用^[17-18]。Banerjee 等^[19]进一步明确烟草花叶病毒感染症状与 CP 基因第 5 770 位单碱基突变之间的密切关联, 当 CP 第 19 位氨基酸相应由 D 替换为 V 时, 轻微绿色花叶症状被取代之严重黄色褪绿症状。Neeleman 等^[20]报道了 CP 在苜蓿花叶病毒感染症状形成中的关键作用, 当碱基突变造成 CP 上 Q²⁹变为 R²⁹后, 病毒感染症状相应地加重, 由褪绿替换为枯斑。Heaton 等^[21]通过构建突变体证明芜菁皱缩病毒外壳蛋白与病毒在本氏烟上的症状表现有关, CP 单氨基酸残基替换可使病毒感染症状弱化。Laakso 等^[22]认为 CP 对芜菁皱缩病毒在寄主细胞间移动起关键作用, D → N 的氨基酸替换影响病毒运动, 造成受侵染寄主不表现症状。de Assis Filho 等^[23]通过基因突变及侵染性试验证实, CP 第 151 位氨基酸残基决定着豇豆黄斑病毒 CCMV 的致病性强弱, 当该氨基酸为 A 时, CCMV 在豇豆上表现为强毒株侵染症状, 而该氨基酸为 V 时, 表现为弱毒株侵染症状。本研究中, CTLV 外壳蛋白第 97、137、138 位氨基酸在强、弱毒分离物之间存在明显差异, 多数弱毒分离物 (4/6) 为 Q⁹⁷或 K⁹⁷、Q¹³⁷、H¹³⁸, 而多数强毒分离物 (10/12) 为 ⁹⁷E、¹³⁷R 或 K¹³⁷、Q¹³⁸。上述差异分别对应于外壳蛋白核苷酸序列第 289 位 (G→A 或 C)、409 位 (A→C) 和 414 位 (G→T) 的碱基突变。这暗示着 CTLV 外壳

蛋白第 97、137、138 位氨基酸可能与病毒的致病性有关, 外壳蛋白基因第 289、409 和 414 位核苷酸同时或单一点突变都可能引起病毒致病力变化, 需要构建侵染性克隆进行基因突变及相关试验进一步研究。

同时, 症状表型是病毒基因之间以及病毒基因与寄主之间复杂相互作用的结果。任何能降低病毒复制, 影响病毒在寄主细胞之间或长距离移动的因素都可以对症状表型产生影响, 除 CP 外, 也有报道认为复制酶、病毒运动蛋白对于病毒致病性表现具有重要作用^[26-27]。并且, 病毒非编码区也可能对病毒所引起的症状表现产生影响^[28]。在本试验中, 少数 CTLV 强(弱)毒分离物外壳蛋白基因第 289、409 和 414 位核苷酸与 CTLV 弱(强)毒分离物相同, 但其症状表型却不同, 可能是 CP 基因并非 CTLV 惟一的致病基因, CTLV 基因组其它序列可能也参与了病毒所引起的症状表现, 这有待进一步试验验证。

在根据 CP 氨基酸序列构建的系统进化树上, 本研究获得的 18 个 CTLV 分离物至少可以划分为两大组群。第 I 组群包括了 LC、XHC、JG 和 YYG、GB、XZX 2 个亚组。第 II 组群包括了 3 个亚组即: (1) CXT、QC4、WZMG; (2) QYPG、XLB、BDZ、HH1、LH; (3) BJNM、YHC、SXH、DYDG。在指示植物上表现较弱症状的多数 (4/6) CTLV 分离物划分在第 I 组群, 而多数 (10/12) CTLV 强毒分离物划分在第 II 组群。由此可见, 根据 CP 氨基酸序列划分的组群对于推断 CTLV 分离物的致病性有一定参考价值。

在根据 31 个 CTLV (ASGV) 分离物 CP 氨基酸序列构建的系统进化树上, 除 AF522459 (Kiwi fruit) 外, 所有 CTLV 分离物与 ASGV 分离物都各自聚集, 并占据不同的分支, 而 CTLV 分离物与 ASGV 分离物 CP 氨基酸序列相似性在 91.1%~98.7%, 这一结果支持 ASGV 与 CTLV 为同一种病毒, 但分属不同株系的论断。

4 结论

来源于中国不同地区、不同寄主品种的 18 个柑橘碎叶病毒 (CTLV) 分离物的外壳蛋白基因相对保守。与碱基突变 G²⁸⁹→A 或 C、A⁴⁰⁹→C 和 G⁴¹⁴→T 相对应, CTLV 外壳蛋白第 97、137、138 位氨基酸在强、弱毒分离物之间存在差异, 可能与病毒的致病性有关。

References

- [1] Garnsey S M. Detection of tatter leaf virus of citrus in Florida.

- Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 1964, 77: 106-109.
- [2] Vela L B, Skaria M. Seven isolates of citrus tatter leaf virus induce varying levels of xylem tissue abnormalities in two citrange rootstocks. *Proceedings of the Fifteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside: IOCV, 2002: 371-372.
- [3] Miyakawa T, Matsui C. A bud-union abnormality of Satsuma mandarin on *Poncirus trifoliata* rootstock in Japan. *Proceedings of the Seventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside: IOCV, 1976: 125-131.
- [4] Ke C, Wu R J. Occurrence and distribution of citrus tatter leaf in Fujian, China. *Proceedings of the Eleventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside: IOCV, 1991: 358-364.
- [5] 赵学源, 蒋元晖, 李世菱, 陈杰忠, 欧阳立. 柑橘碎叶病的初步鉴定. *中国柑桔*, 1987, (1): 28-29.
- Zhao X Y, Jiang Y H, Li S L, Chen J Z, Ouyang L. Preliminary identification of citrus tatter leaf disease. *Citrus of China*, 1987, (1): 28-29. (in Chinese)
- [6] 张天淼, 梁仙友. 柑桔碎叶病毒在黄岩本地早、椪桔上的发现. *中国南方果树*, 1987, (1): 27.
- Zhang T M, Liang X Y. Occurrence and detection of citrus tatter leaf virus in Zhejiang province. *South China Fruits*, 1987, (1): 27. (in Chinese)
- [7] 刘干生, 刘 震, 刘尚泉, 龙安农, 陈辉球. 柑桔碎叶病危害的调查. *中国南方果树*, 2003, 32(2): 22.
- Liu G S, Liu Z, Liu S Q, Long A N, Chen H Q. Investigation on damage of citrus tatter leaf disease. *South China Fruits*, 2003, 32(2): 22. (in Chinese)
- [8] van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, Carstens E B, Estes M K, Lemon S M, Maniloff J, Mayo M A, McGeoch D J, Pringle C R, Wickner R B. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2000: 952-956.
- [9] Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Miyakawa T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from Apple, Japanese pear, European pear, and Citrus trees. *Phytopathology*, 1997, 87(4): 389-396.
- [10] Ohira K, Namba S, Rozanov M, Kusumi T, Tsuchizaki T. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 2305-2309.
- [11] Yoshikawa N, Sakaki E, Kato M, Takahashi T. The nucleotide sequence of apple stem grooving capilloviruses genome. *Virology*, 1992, 191: 98-105.
- [12] Terauchi H, Magome H, Yoshikawa N. Nucleotide sequence of the genome of apple stem grooving capilloviruses isolate and construction of an infectious cDNA clone. *Annual of Phytopathology Society in Japan*, 1997, 63: 432-436.
- [13] 郑银英, 洪 霓, 王国平, 胡红菊. 苹果茎沟病毒梨分离物外壳蛋白基因的克隆和序列分析. *植物病理学报*, 2006, 36(1): 62-67.
- Zheng Y Y, Hong N, Wang G P, Hu H J. Cloning and sequence analysis for the CP gene of Apple stem grooving virus from pears. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(1): 62-67. (in Chinese)
- [14] 孟祥春, 向 旭, 钟 云, 刘 岩, 易干军. 砂糖橘上碎叶病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析. *果树学报*, 2007, 24(6): 796-798.
- Meng X C, Xiang X, Zhong Y, Liu Y, Yi G J. Cloning and sequencing the coat protein gene of citrus tatter leaf virus from Shatangju mandarin cultivar. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(6): 796-798. (in Chinese)
- [15] Takeshita M, Suzuki M, Takanami Y. Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. *Archives of Virology*, 2001, 146: 697-711.
- [16] Shintaku M H, Zhang L, Palukaitis P. A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *The Plant Cell*, 1992, 4: 751-757.
- [17] Dawson W O, Bubrick P, and Grantham G L. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopathology*, 1988, 78(6): 783-789.
- [18] Knorr D A, Dawson W O. A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85: 170-174.
- [19] Banerjee N, Wang J Y, Zaitlin M. A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology*, 1995, 207: 234-239.
- [20] Neelman L, van Der Kuy A, Bol J F. Role of alfalfa mosaic virus coat protein gene in symptom formation. *Virology*, 1991, 181: 687-693.
- [21] Heaton L A, Lee T C, Wei N, Morris T J. Point mutations in the turnip crinkle virus capsid protein affect the symptoms expressed by *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, 1991, 183: 143-150.
- [22] Laakso M M, Heaton L A. Asp→Asn substitutions in the putative calcium-binding site of the turnip crinkle virus coat protein affect virus movement in plants. *Virology*, 1993, 197: 774-777.

- [23] de Assis Fiho F M, Paguio O R, Sherwood J L, Deom C M. Symptom induction by cowpea chlorotic mottle virus on *Vigna unguiculata* is determined by amino acid residue 151 in the coat protein. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 879-883.
- [24] 何新华, 蒋元晖, 赵学源. 11 个柑桔碎叶病毒分离株致病力强弱的比较(初报). 云南农业大学学报, 1996, 8(3): 240-241.
- He X H, Jiang Y H, Zhao X Y. Comparison of pathogenicity between 11 isolates of citrus tatter leaf virus. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 1996, 8(3): 240-241. (in Chinese)
- [25] 周常勇, Hailstones D L, Connor R, Barkley P, Bowyer J. 一种微量、快速抽提柑桔衰退病毒(CTV)核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法. 福建农业学报, 2001, 30(增刊): 200.
- Zhou C Y, Hailstones D L, Connor R, Barkley P, Bowyer J. A micro and rapid nucleotide acid extraction method of Citrus tristeza virus for amplification by RT-PCR. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2001, 30(Suppl.): 200. (in Chinese)
- [26] Hagiwara K, Ichiki T U, Ogawa Y, Omura T, Tsuda S. A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper: the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Archives of Virology*, 2002, 147: 833-340.
- [27] Fujita Y, Mise K, Okuno T, Ahlquist P, Furusawa I. A single codon change in a conserved motif of a Bromovirus movement protein gene confers compatibility with a new host. *Virology*, 1996, 223: 283-291.
- [28] Van der vossen E A G, Neeleman L, Bol J F. The 5' terminal sequence of alfalfa mosaic virus RNA3 is dispensable for replication and contains a determinant for symptom formation. *Virology*, 1996, 221: 271-280.

(责任编辑 曲来娥)

欢迎订阅 2010 年《农业网络信息》(月刊)

《农业网络信息》(原计算机与农业)创刊于 1986 年,是由农业部主管、中国农业科学院农业信息研究所主办的国内外公开发行的综合性中央级刊物,现已被《中国期刊全文数据库》、《中文科技期刊数据库》、国家“九五”重点科技攻关项目《万方数据—数字化期刊群(中国核心期刊遴选数据库)》及光盘收录。

主要报道国内外农业领域中有关计算机和信息技术应用研究的新进展、新成果、新技术、新产品、新信息和应用的动态等。现辟有“综述与专论”、“研究与开发”、“农业信息化”、“信息资源建设与管理”、“网络与电子商务/政务”、“信息教育”、“交流园地”、“应用实践”等栏目。本刊内容丰富翔实,欢迎新老读者踊跃订阅。

本刊为月刊,大 16 开本,每期定价:15.00 元/册,全年定价:180 元。国内统一刊号:CN 11-5065/TP,国际统一刊号:ISSN 1672-6251,国内外公开发行。邮发代号 18-270。全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至本刊编辑部订阅(免收邮费)。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院农业信息研究所《农业网络信息》编辑部(邮政编码:100081)
电话:010-82109657; E-mail: nywlxx@caas.net.cn