

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201903068

侵染昆明园林植物的 4 个 HCRV 分离株核壳体蛋白氨基酸序列分析*

王宇琪^{1#}, 吴保为^{1#}, 陶宏征², 贾志强², 高雪¹, 王景文¹, 刘雅婷^{2**}

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】比较分析侵染昆明园林植物 HCRV 核壳体蛋白氨基酸序列, 探究地理分布和寄主来源与病毒变异的相关性。【方法】2016 年, 在云南省昆明市园林景区采集疑似感染番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)病毒样品, 利用 RT-PCR 技术测定出葱莲(*Zephyranthes candida*)、文殊兰(*Crinum asiaticum*)、喜林芋(*Philodendron schott*)和酢浆草(*Oxalis corniculata*)4 份感染朱顶红褪绿环斑病毒(*Hippeastrum chlorotic ringspot virus*, HCRV)的样品, 通过克隆、测序获得 4 份样品的 S RNA 序列, 利用 ORF Finder 获得核壳体蛋白(nucleocapsid protein, N)并进行序列分析。【结果】文殊兰、喜林芋和酢浆草是首次报道的 HCRV 新寄主; 4 个 HCRV 分离物的 N 蛋白与 NCBI 首次报道的 HLS1-2 N 蛋白(登录号: AFX74694)一致性达到 99.34%; 系统进化树分析显示: 4 个 HCRV 分离物与 GenBank 公布的同样来自云南的株系聚为 1 支。【结论】病毒的地理分布相关性强于寄主相关性。

关键词: 朱顶红褪绿环斑病毒; 核壳体蛋白; 序列分析

中图分类号: S 436.412.11

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0165-04

Amino Acid Sequence Analysis of Four Isolates of *Hippeastrum Chlorotic Ringspot Virus* Nucleocapsid Protein in Several Garden Plants in Kunming

WANG Yuqi¹, WU Baowei¹, TAO Hongzheng², JIA Zhiqiang²,
GAO Xue¹, WANG Jingwen¹, LIU Yating²

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] The amino acid sequences of HCRV nucleocapsid proteins in Kunming garden plants were compared and analyzed, to explore the viruses variation correlation between geographical distribution and host sources. [Method] In 2016, samples of suspected *Tospovirus* virus were collected in the garden scenic spot of Kunming City, Yunnan Province. Four samples of HCRV infected with *Zephyranthes candida*, *Crinum asiaticum*, *Philodendron schott* and *Oxalis corniculata* were determined by RT-PCR. Four samples of S RNA sequences were found by cloning and sequen-

收稿日期: 2019-03-26

修回日期: 2020-11-10

网络首发时间: 2021-01-08 07:22:46

*基金项目: 云南省重点项目(2018FA019); 国家自然科学基金项目(31471828, 31260451)。

作者简介: #对本文文献等同, 为并列第一作者。王宇琪(1993—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事植物与病原物的互作研究。E-mail: 2256499615@qq.com; 吴保为(1988—), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要从事植物与病原物的互作研究。E-mail: wubaowei250@163.com

**通信作者 Corresponding author: 刘雅婷(1971—), 女, 湖南祁东人, 博士, 教授, 主要从事植物与病原物的互作研究。E-mail: liuyating66@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210106.1109.001.html>



cing and the nucleocapsid (N) protein was obtained using the online software ORF Finder and sequence analysis. [**Result**] *C. asiaticum*, *P. schott* and *O. corniculata* are the first reported new hosts of HCRV. The N protein of the four HCRV isolates and the first reported HLS1-2 N protein of NCBI identity reached 99.34%. The phylogenetic tree shows that the HCRV isolated from Yunnan in this study is clustered with the same strain from Yunnan published by GenBank. [**Conclusion**] The geographical distribution of the virus is stronger than the host correlation.

Keywords: Hippeastrum chlorotic ringspot virus; nucleocapsid protein; sequence analysis

朱顶红褪绿环斑病毒 (Hippeastrum chlorotic ringspot virus, HCRV) 是泛布尼亚病毒科 (Peribunyaviridae) 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒, 2013 年在中国云南被首次发现并报道^[1], 本课题组首次报道了朱顶红褪绿环斑病毒的全基因组序列^[2-3]。朱顶红褪绿环斑病毒能系统侵染一点红、番茄、茼蒿、旱金莲和豇豆等经济作物, 主要症状为同心环纹、叶片畸形、局部褪绿和坏死^[4], 对农业生产造成了严重的威胁。HCRV 为三分子基因组, 分别是 L RNA、M RNA 和 S RNA。L RNA 仅有 1 个开放阅读框, 正向编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp); M RNA 正向编码非结构蛋白 (non-structural protein of M RNA, NSm), 互补链编码糖蛋白前体 (glycoproteins, Gn/Gc); S RNA 正向编码非结构蛋白 NSs (non-structural protein of S RNA, NSs), 互补链编码核壳体蛋白 (nucleocapsid protein, N)^[5], N 蛋白序列保守程度较高^[6], 因此通常被用于进行 *Tospovirus* 属病毒的分类检测和鉴定^[7], N 蛋白也可能与病毒粒子装配有关^[8]。本研究通过 RT-PCR 鉴定出葱莲、文殊兰、喜林芋和酢浆草感染 HCRV 的 4 份样品。为研究核壳体蛋白序列特征, 通过 RT-PCR、克隆和测序得到样品完整的 HCRV S RNA 序列, 利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获得其 N 蛋白序列并进行分析, 为 HCRV 的后续研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料采集

2016 年在云南省昆明市主要园林景区进行了调查, 采集到八角金盘 (*Fatsia japonica*)、葱莲 (*Zephyranthes candida*)、酢浆草 (*Oxalis corniculata*)、旱金莲 (*Tropaeolum majus*)、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)、文殊兰 (*Crinum asiaticum*)、

喜林芋 (*Philodendron schott*) 和鸢尾 (*Iris tectorum*) 等疑似感染番茄斑萎病毒属病毒样品 (图 1), 主要表现为褪绿、坏死斑和皱缩等症状, 将采集回来的样品用 RT-PCR 进行鉴定。

1.2 总 RNA 提取

采用去除多糖多酚的 TransZol Plant (全式金生物技术有限公司, 北京) 试剂盒提取 RNA, 以 RNA 为模板, 采用 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (宝生物技术有限公司, 大连) 进行反转录合成 cDNA。

1.3 RT-PCR 扩增、克隆及测序

利用 Primer Premier 6.0 软件, 以 GenBank 中公布的 HCRV S RNA 序列 (序列号: JX-833564.1) 设计引物, S RNA 扩增引物为: F: 5'-AGAGCAATCGAGGTATAAACAAATAAT-CATACAC-3'; R: 5'-AGAGCAATCGAGGTATA-AAACATAAATTCTGAAC-3'。50 μL PCR 反应体系: cDNA 1 μL, 上下游引物各 1 μL, FastPfu 1 μL, Buffer 10 μL, dNTP 4 μL, ddH₂O 32 μL。PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 20 s, 50 °C 20 s, 72 °C 1.5 min, 40 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 反应产物用于 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将获得的 PCR 产物进行纯化以及加 A 反应。将已纯化的 PCR 产物连接在 pEASY-T1 载体上, 将连接产物导入 T1 感受态细胞中, 经过菌液 PCR 鉴定出阳性重组子并送到公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

通过 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获得 4 个 HCRV 分离物的 N 蛋白序列, 利用 DNAMAN 8.0 与分离自云南省蜘蛛兰上的 HLS1-2 N 蛋白 (登录号: AFX74694) 进行序列比对分析; 利用 MEGA 6.06 软件对 NCBI 数据库中已公布的分离自云南、广东、广西和福建地区蜘蛛兰上的 HCRV 的 N 蛋白以及本研究获得的 4 个寄主的 N 蛋白进行系统进化分析。

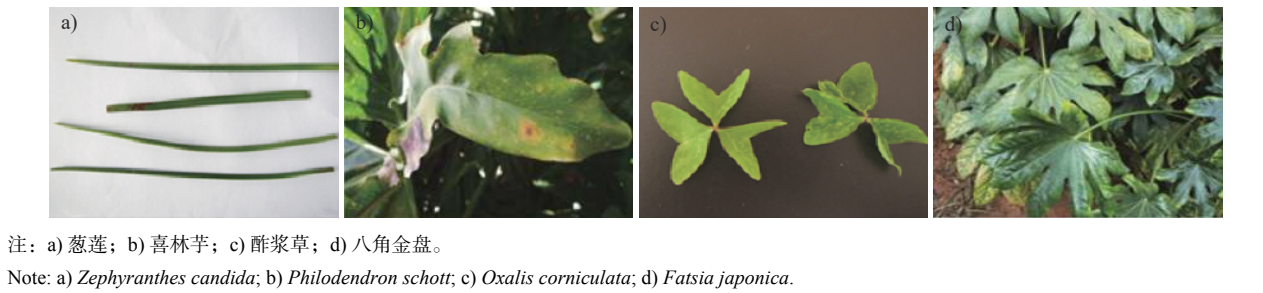
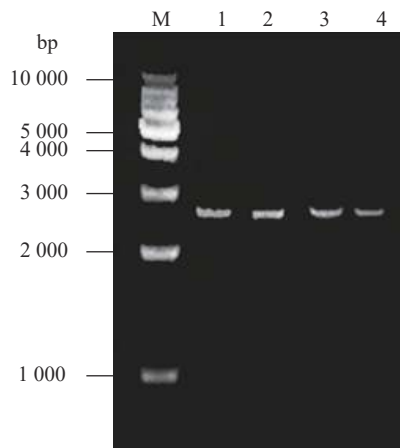


图 1 疑似感染番茄斑萎病毒属病毒样品
Fig. 1 Samples suspected infection with *Tospovirus* virus

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 结果

通过 RT-PCR 技术鉴定出葱莲、文殊兰、喜林芋和酢浆草 4 份感染 HCRV 的样品并扩增出 HCRV S RNA 序列, 电泳检测条带大小约为 2 700 bp (图 2)。



注: M. Marker; 1. 酢浆草; 2. 葱莲; 3. 文殊兰; 4. 喜林芋。
Note: M. Marker; 1. *O. corniculata*; 2. *Z. candida*; 3. *C. asiaticum*; 4. *P. schottii*.

图 2 HCRV S RNA 扩增结果
Fig. 2 Amplification of HCRV S RNA

2.2 不同株系 HCRV N 蛋白序列比对分析

本研究获得的葱莲 YN-ZCH、文殊兰 YN-CA、喜林芋 YN-PS 和酢浆草 YN-OC 的 N 蛋白, 通过 DNAMAN 8.0 与首个公布的 HLS1-2 N 蛋白进行序列比对, 一致性达到 99.34%。YN-ZCH 存在 6 个突变位点, YN-CA 存在 5 个突变位点, YN-PS 存在 4 个突变位点, YN-OC 存在 6 个突变位点 (表 1)。

2.3 不同株系 HCRV N 蛋白系统进化分析

利用 MEGA 6.06 软件对 NCBI 数据库中已公

表 1 氨基酸突变位点
Tab. 1 Amino acid mutation sites

病毒株系 virus strains	氨基酸位点 amino acid site								
	2	9	50	82	113	118	178	241	249
HCRV-HLS1-2	S	A	N	A	N	Q	I	E	V
HCRV-YN-ZCH	T	V	N	V	S	Q	V	E	A
HCRV-YN-CA	T	V	N	V	N	Q	V	G	V
HCRV-YN-PS	T	V	N	V	N	Q	V	E	V
HCRV-YN-OC	T	V	S	V	N	R	V	E	V

布的 HCRV 的 N 蛋白以及本研究获得的 4 个寄主的 N 蛋白构建系统发育树, 建树方法选择邻接法 (neighbor-joining, NJ)。结果显示: 本研究获得的 4 个 HCRV 分离物的 N 蛋白与分离自云南省的 HCRV N 蛋白聚为 1 支, 来自广东、广西和福建地区的聚为 1 支 (图 3)。

3 讨论

云南省丰富的植物资源和复杂的气候以及丰富的传播介体种类为 *Tospovirus* 病毒的发生和流行提供了条件, 该属病毒在云南的发生呈逐年上升趋势^[9]。自 2013 年首次在云南省发现 HCRV 至今, 国内外对其研究较少, 目前已知寄主包括蜘蛛兰、烟草、番茄、君子兰^[10]和葱莲^[11]等, 仍有许多寄主尚未被发现。本研究鉴定出葱莲、文殊兰、喜林芋和酢浆草 4 个感染 HCRV 样品, 其中文殊兰、喜林芋和酢浆草是首次报道的 HCRV 寄主。研究结果表明: 4 个 HCRV 分离物的 N 蛋白与 NCBI 首次公布的 HLS1-2 N 蛋白有较高的同源性, 从系统发育分析可知不同株系的分离物聚类现象与寄主无明显关联, 推测可能环境因子对病毒进化的影响强于寄主的影响。

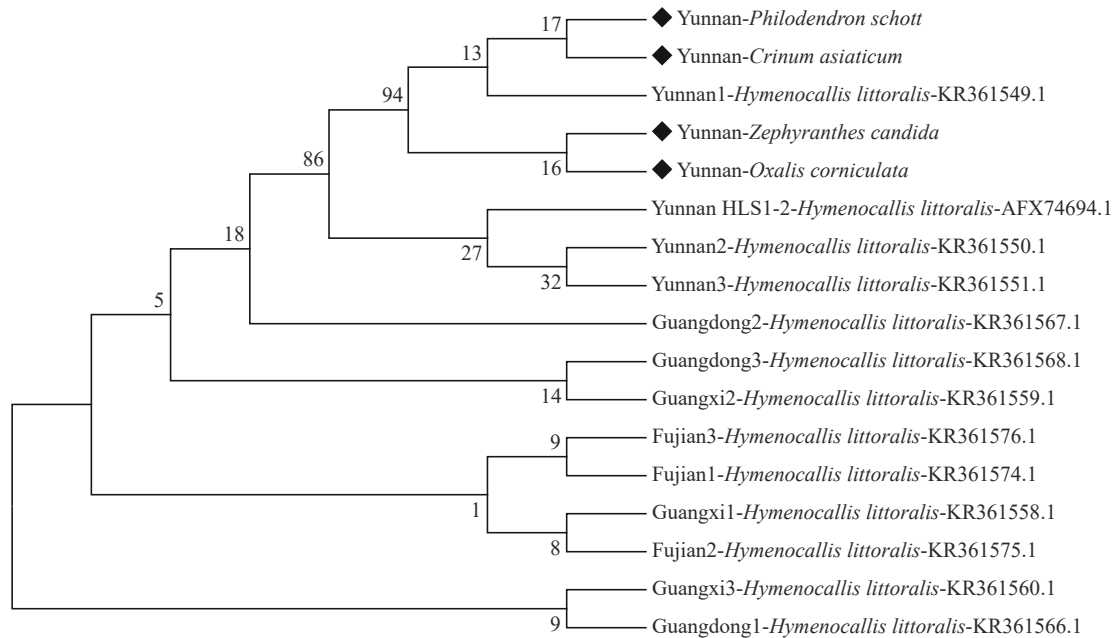


图 3 HCRV N 蛋白氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of HCRV N protein amino acid sequence

4 结论

本研究通过采集疑似感染番茄斑萎病毒属病毒的样本,应用症状学和分子生物学方法鉴定出了葱莲、文殊兰、喜林芋和酢浆草 4 个感染 HCRV 样品,对 4 个寄主植物 S RNA 序列中 N 蛋白进行序列比对和系统进化分析,结果表明 4 个 HCRV 分离物 N 蛋白与 NCBI 公布的 HLS1-2 N 蛋白有较高的同源性,HCRV 病毒的地理分布相关性强于寄主相关性。研究结果为 HCRV 的进化研究提供基础,也为进一步探究番茄斑萎病毒属病毒的扩散和进化策略提供参考。

[参考文献]

- [1] DONG J H, YIN Y Y, FANG Q, et al. A new tospovirus causing chlorotic ringspot on *Hippeastrum* sp. in China[J]. Virus Genes, 2013, 46(3): 567. DOI: [10.1007/s11262-012-0873-z](https://doi.org/10.1007/s11262-012-0873-z).
- [2] XU Y, LOU S G, LI X L, et al. The complete S RNA and M RNA nucleotide sequences of a hippeastrum chlorotic ringspot virus (HCRV) isolate from *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb in China[J]. Archives of Virology, 2013, 158(12): 2597. DOI: [10.1007/s00705-013-1756-x](https://doi.org/10.1007/s00705-013-1756-x).
- [3] XU Y, LOU S G, LI Q F, et al. Molecular characterization of the hippeastrum chlorotic ringspot virus L segment and its protein[J]. Archives of Virology, 2014, 159(10): 2805. DOI: [10.1007/s00705-014-2100-9](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2100-9).

- [4] LI Q, XU Y, ZHU M, et al. Genetic diversity of the nucleocapsid protein gene of hippeastrum chlorotic ringspot virus from *Hymenocallis littoralis* in Southern China[J]. Acta Virologica, 2017, 61(1): 116. DOI: [10.4149/av_2017_01_116](https://doi.org/10.4149/av_2017_01_116).
- [5] 尚卫娜. 番茄斑萎病毒和番茄环纹斑点病毒细胞病理学及其运动蛋白的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [6] 高君直, 吴保为, 高雪, 等. 云南不同地区蜘蛛兰上朱顶红褪绿环斑病毒RNA S序列分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2017, 32(2): 218. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2017.02.005](https://doi.org/10.16211/j.issn.1004-390X(n).2017.02.005).
- [7] 吴兴海, 陈长法, 余冬冬, 等. 番茄斑萎病毒N基因克隆及其植物表达载体的构建[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3939.
- [8] 张仲凯. 番茄斑萎病毒属病毒颗粒在寄主植物中的装配与运动机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [9] 黄亚宁, 董玉梅, 徐烨, 等. 昆明市园艺植物番茄斑萎病的初步鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(4): 648. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2015.04.026](https://doi.org/10.16211/j.issn.1004-390X(n).2015.04.026).
- [10] 吴保为, 吴家琪, 胡玉洁, 等. 朱顶红褪绿环斑病毒云南君子兰分离物S序列的克隆及分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(14): 38. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.010](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.010).
- [11] WU B W, LIU Y T. First report of hippeastrum chlorotic ringspot virus infecting *Zephyranthes candida* in China[J]. Plant Disease, 2017, 101(11): 1960. DOI: [10.1094/PDIS-12-16-1837-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1837-PDN).

责任编辑: 何承刚