



## 研究报告

### A Letter

# 苹果茎痘病毒梨分离物外壳蛋白基因的克隆与分子变异分析

刘娜<sup>✉</sup>, 牛建新<sup>✉</sup>

石河子大学农学院园艺系, 石河子, 832003

✉ 通讯作者: njx105@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 92 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0092

收稿日期: 2011 年 06 月 17 日

接受日期: 2011 年 07 月 05 日

发表日期: 2011 年 07 月 12 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

刘娜等, 2011, 苹果茎痘病毒梨分离物外壳蛋白基因的克隆与分子变异分析, 分子植物育种(online) Vol.9 No.92 pp.1653-1661 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0092)

引用格式(英文):

Liu et al., 2011, Cloning and Sequencing and Molecular Variability of *Apple stem pitting virus* CP Gene from Pear, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.92 pp. 1653-1661 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0092)

**摘要** 本研究利用 RT-PCR 技术扩增了来自新疆地区的库尔勒香梨、鸭梨的苹果茎痘病毒外壳蛋白基因, 克隆测序结果表明, ASVP CP 基因全长 1 194 bp, 编码 397 个氨基酸, 分子量约 42 KDa。与 GenBank 上公布的 25 个 ASVP CP 基因编码的氨基酸序列的同源率为 70% 左右。多重氨基酸序列比对结果显示, aa1-177 之间变异较大, 为高变区, 而后 130 个氨基酸高度保守。对 CP 基因位点扫描发现, CP 基因的活性和识别位点主要分布在高度保守区域, 位点包括: Cys 位于 aa292, ProProXXTrp 位于 aa309-313, AryXPheAspPhe 位于 aa325-329 及 Pro 位于 aa349。系统进化分析结果表明, 来自世界各地的 ASPV 分离物可分为 3 大类群, 分别为: 第一类群是以苹果为寄主的类群, 第二类群是以梨为寄主的类群, 第三类群是以新疆栽培的梨品种为寄主的类群。呈现一定的寄主相关性。

**关键词** 苹果茎痘病毒; 库尔勒香梨; 外壳蛋白基因; 序列分析

## Cloning and Sequencing and Molecular Variability of *Apple stem pitting virus* CP Gene from Pear

Liu Na<sup>✉</sup>, Niu Jianxin<sup>✉</sup>

Department of Horticulture, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, 832003, P.R., China

✉ Corresponding author, njx105@163.com; ✉ Authors

**Abstract** Xinjiang Korla pears and Ya pears were detected for Apple stem pitting virus (ASPV) by RT-PCR, cloned and sequenced. Sequence analysis showed that the full-length sequence of CP gene consist of 1 194 nt and encode a polypeptide of 397 amino acid (aa) with molecular mass (Mr) of 42 kDa. Identities of aa sequences between 3 isolates of Xinjiang and other isolates in GenBank were about 70%. Alignment of the amino acid sequences showed that aa1-177 is the domain of high variability and at the end of aa 130 is the highly conserved domain. Motif scan showed that the motifs of CP gene were distributed in conserved domain, the motif includes: Cys (aa292), ProProXXTrp (aa309-313), AryXPheAspPhe (aa325-329) and Pro (aa349). Phylogenetic analysis showed that all isolates of ASPV can form three groups, host of group I is apple, host of group II is pear and the host of group III is pear which cultivated in Xinjiang. The groups were slightly related to host.

**Keywords** Apple stem pitting virus; Korla pear; Coat protein gene; Sequencing analysis

### 研究背景

苹果茎痘病毒(*Apple stem pitting virus*, ASPV)是凹陷病毒属(*Foveavirus*)的典型代表, 为线状弯曲病毒(Martelli and Jelkmann, 1998)。ASPV 是一种严重危害果树生产的潜隐性病毒, 主要侵染苹果和梨, 广泛分布于世界各地的苹果和梨种植区。由 ASPV 引起的梨树病害有梨石痘病(Pear stony pit)、梨茎痘病(Pear stem pitting)、梨脉黄病(Pear vein

yellow)等多种病害, 并常伴随苹果褪绿叶斑病毒(*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)和苹果茎沟病毒(*Apple stem groove virus*, ASGV)进行复合式侵染, 引起果实品质变劣, 产量降低, 造成严重的经济损失。

目前在 GenBank 上登录 ASPV 分离物全基因组序列仅有 4 条, 分别为德国分离物 PA66, 登录号为 NC\_003462 (Jelkmann, 1994); 日本分离物 IF38,

登录号为 AB045371 (Yoshikawa et al., 2001); 中国分离物 PR1, 登录号为 EU095327 和印度分离物 Palampur, 登录号为 FR694186。而有关 ASPV CP 基因的完整编码序列或部分序列已有来自不同国家和地区的很多报道。现有的基因组序列和部分序列已表明 ASPV 不同分离物存在着复杂的分子变异。因此, 非常有必要系统开展 ASPV 的分子变异、遗传进化和株系分化研究。但目前国内外报道的 ASPV 全长基因组序列仅有 4 条, 利用这 4 条序列开展 ASPV 的遗传进化及分子变异研究尚存在一定局限性。Nemchinov 等(1998)采用 PCR 技术检测了不同寄主的 ASPV, 同时对不同分离物进行了序列分析; Schwarz 和 Jelkmann (1998)检测了欧洲梨和苹果分离物的 ASPV, 进行了外壳蛋白基因的序列分析。分析结果均表明 ASPV 不同分离物间存在变异。然而国内外关于 ASPV CP 基因分子变异及遗传进化研究方面系统报道较少, 因此, 利用外壳蛋白基因序列开展分子变异研究十分必要。通过了解病毒变异规律及株系分类情况, 明确病毒变异特点对更好的认识病毒和控制病毒具有重要意义。本研究分别从新疆库尔勒地区香梨园中采集库尔勒香梨、鸭梨、砀山梨等主要栽培品种, 通过对 ASPV CP 基因不同分离物的克隆及详细的序列分析, 以明确其分子变异规律和分类特点。

## 1 结果与分析

### 1.1 ASPV CP 基因的 RT-PCR 扩增

以感染 ASPV 的库尔勒香梨 KL1、KL9、鸭梨 Y3 及砀山梨的枝条韧皮部为试材, 将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链后, 利用设计的引物 PS/PA 进行 RT-PCR 扩增, KL1、L9、鸭梨 Y3 分别扩增出了预期片段, 大小为 1 392 bp, 包含了完整的 CP 基因。感染 ASPV 的砀山梨没有扩增出目的片段(图 1)。

### 1.2 ASPV 外壳蛋白基因的克隆与鉴定

RT-PCR 产物经回收纯化后连接到 PMD19-T 带有抗氨苄青霉素(Amp<sup>r</sup>)抗性的载体上, 热击转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。通过含有 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h~16 h, 进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落, 振荡培养后, 用裂解法小量提取重组质粒 DNA, 做重组质粒的 PCR 及酶切鉴定(图 2)。将鉴定正确的质粒菌液送往上海生工生物技术有限公司测序。

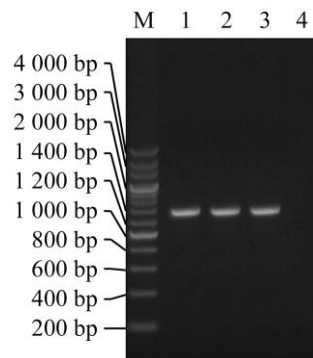


图 1 ASPV CP 基因的 RT-PCR 检测

注: M: DNA 分子标量; 泳道 1: KL1; 泳道 2: KL9; 泳道 3: Y3; 泳道 4: 阴性对照

Figure 1 Detection of ASPV CP gene by RT-PCR

Note: M: DNA marker; Lane 1: KL1; Lane 2: KL9; Lane 3: Y3 RT-PCR product; Lane 4: Negative control

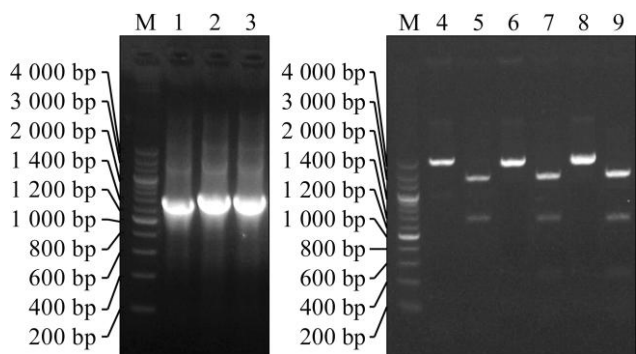


图 2 重组质粒的 PCR, 酶切鉴定

注: M: Mark; 泳道 1: KL1; 泳道 2: KL9; 泳道 3: Y3; 泳道 4: KL1 单酶切; 泳道 5: KL1 双酶切; 泳道 6: KL9 单酶切; 泳道 7: KL9 双酶切; 泳道 8: Y3 单酶切; 泳道 9: Y3 双酶切

Figure 2 Identification of recombinant plasmid by PCR and Restriction enzyme

Note: M: Mark; Lane 1: KL1; Lane 2: KL9; Lane 3: Y3; Lane 4: KL1 signal enzyme-digested; Lane 5: KL1 double enzyme-digested; Lane 6: KL9 signal enzyme-digested; Lane 7: KL9 double enzyme-digested; Lane 8: Y3 signal enzyme-digested; Lane 9: Y3 double enzyme-digested

### 1.3 ASPV 外壳蛋白基因的序列测定

测序分析结果表明, 3 个分离物(KL1、KL9、Y3)的 ASPV 外壳蛋白基因片段大小均为 1 194 bp, 编码 397 个氨基酸, 分子量约为 42 kDa。将序列提交至 GenBank, 登录号分别为 JF946775、JF946773、JF946774。ASPV CP-KL1 中含有 316 个 A, 292 个 T, 293 个 G 和 293 个 C, 各碱基在 CP 基因中的百分含量分别为 26.3%、24.5%、24.5%和 24.5%; ASPV CP-KL9 中含有 314 个 A, 291 个 T, 296 个 G 和

293 个 C, 各碱基在 CP 基因中的百分含量分别为 26.5%、24.4%、24.6%和 24.5%; ASPV CP-Y3 中含有 320 个 A, 291 个 T, 288 个 G 和 295 个 C, 各碱基在 CP 基因中的百分含量分别为 26.8%、24.4%、24.1%和 24.7%; 三条序列的碱基变化显示, A 和 G 的变异较大, 从而引起编码的氨基酸序列发生变化。

#### 1.4 ASPV 外壳蛋白基因的序列分析

到目前为止, 已经报道的 ASPVCP 基因完整编码序列 25 条(表 1)。通过 DNAMAN、Clustalx 及 MEGAR 4.0 等软件分析, 对本研究得到的 3 个 ASPV CP 基因的分离物(KL1, KL9, Y3)同已报道的 ASPV CP 基因分离物的全序列进行同源性、系统进化及分子变异分析。

##### 1.4.1 同源性分析

KL1 与 KL9、Y3, KL9 与 Y3 的核苷酸序列同源率分别为 90.5%、90.2%和 96.7%; 氨基酸序列的

同源率分别为 93.0%、92.7%和 97.3%; 与 GenBank 上公布的 20 多个 ASPV 分离物的 CP 基因氨基酸序列进行比对分析, 不论按其地理分布还是根据寄主范围, 三个分离物与其比对的同源率均为 68.2%~74.4% (表 2)。

氨基酸序列多重比对结果表明, aa1-177 出现较大变异, 为高变区, 其中在 aa28-46, NC\_003462 多了 18 个氨基酸, HM352767 在 aa37-50 多了 14 个氨基酸, KL1、KL9 及 Y3 在 aa129-130 处发生缺失(图 3)。而后 130 个氨基酸则为高度保守区域。研究表明, ASPV CP 基因的变异在每个分离物中普遍发生, 没有呈现一定的规律性。对 CP 基因的氨基酸序列位点扫描分析发现, CP 基因识别位点主要分布在高度保守区, 位点分别为: Cys 位于 aa292, ProProXXTrp 位于 aa309-313, AryXPheAspPhe 位于 aa325-329 和 Pro 位于 aa349, 这些位点是外壳蛋白基因的活性和识别位点。

表1 ASPV CP基因分离物登录号及地理来源

Table 1 Accession number and geographical origin of the isolate of ASPV CP gene

序列号 Accession No.	分离物 Isolate name	寄主 Host	国家 Country	序列号 Accession No.	分离物 Isolate name	寄主 Host	国家 Country
NC_003462	PA66	苹果 Apple	德国 Germany	AY572458	br1	梨 Pear	巴西 Brasil
AB045371	IF38	苹果 Apple	日本 Japan	EU314950	WS	苹果 Apple	中国 China
DQ003336	MHczAp	苹果 Apple	捷克 Czech Republic	EU708018	p1	梨 Pear	中国 China
AF438521	MT32	苹果 Apple	波兰 Poland	HM352726	VY1	梨 Pear	中国 China
AF438522	MT24	苹果 Apple	波兰 Poland	HM125156	PV11	苹果 Apple	中国 China
AF345892	ST54	梨 Pear	波兰 Poland	HM125157	PV2	苹果 Apple	中国 China
AF345893	GNKVII/34	梨 Pear	波兰 Poland	HM125158	PV7	苹果 Apple	中国 China
AF345894	ST132	梨 pear	波兰 Poland	HM125159	PV5	苹果 Apple	中国 China
AF345895	ST113	梨 Pear	波兰 Poland	FJ619187	38	苹果 Apple	中国 China
AF491929	GNKVIII/45	梨 Pear	波兰 Poland	FJ619188	24	苹果 Apple	中国 China
AF491930	J335	苹果 Apple	波兰 Poland	FR694922	Palampur	苹果 Apple	印度 India
AF491931	N1	苹果 Apple	波兰 Poland	FN433599	Rohru	苹果 Apple	印度 India
AF495382	ST181	苹果 Apple	波兰 Poland				

AF345894	MTSNGSEPPASTPLVSAVETTATASAP-----ISSVASSAL-----	36
AF345895	MTSNGSEPPASTPLVSAVETTATASAP-----ISSVASSVL-----	36
AY572458	MASDGSQPASTPLTSVEESTAAASAP-----ISSAISSAP-----	36
HM352767	MASNVSQPQTSTPLSSVAESTAAASAP-----NSSVAISAPTSAPAA	42
AF345892	MTSNESQPPASLPVASVEETAAPASAP-----SSSVAVSAP-----	36
AF438521	MTSNGSQPQSSAPMVSVEEPAAAVSAP-----NPSVVNSAP-----	36
FJ619187	MASNGSQPQVSAPITSVEEPVAVSGP-----NPSVTSAP-----	36
DQ003336	MTSNGSQPMTSAPMVSVEETPAPVSAP-----NPSVVSSVP-----	36
AF491930	MTSNGSQPMASAPMVSVEETPASVSAP-----NPSIVSSVP-----	36
AF491931	MTSNGSQSMTSAPMVSVEEPSAPVSAP-----NPSVVSSVP-----	36
FJ619188	MASNGSSPLTSAPMVSVEEQVNPVSV-----NPSVVSSVP-----	36
AB045371	MASNGSQPPASAPMVSVEEPVNPVSV-----NPSVVSSVP-----	36
FN430678	MASNGGQPPASAPMVSVEEPTASASAP-----ISNVVSAAP-----	36
FR694922	MASNGGQPPASAPMVSVEEPTASASAP-----ISNVVSAAP-----	36
HM125158	MASNGTQPPVSVPMVSIIEPIAPASTP-----ISSAVSSAP-----	36
HM125156	MASNGSQPIPSAPMVSVEEPVAAASTP-----NPSVVSSIS-----	36
HM125157	MASNGTQPPASTPMVSVEEPTAPVSAP-----NPSVVSSAP-----	36
AF438522	MTSNGSQLPSSTPMVSVEGSAVVSAP-----NPSVVSSSTP-----	36
AF495382	MTSNGSQLPSSTPMVSVEESVAVVSAP-----NPSVVSSSTP-----	36
EU314950	MTSNGSQPPSSTPMVSVEENVAPVSTP-----NPSVVNSAP-----	36
HM125159	MASNGSQPPSSTPMVSVEEPAAAVSAP-----ISSVESSTP-----	36
EU708018	MTSNGSETPSSTPSVSAVSSAAASAP-----ISSMESSIP-----	36
AF491929	MASDGSQPPSSTPISVVEDSTAAVVSAP-----ISSVASSTP-----	36
AF345893	MTSNGSQPPASTPLVSAEPPAAASAP-----ISSAVSSTP-----	36
NC003468	MTSNGSQPQASTPMVSAEPPAAASVFNSTPMVSAEGPAAAVSAPNSSVVSSAP-----	36
JF946773	MASDGVSSSTSTPMISVDETTAAASAP-----NSSVSVPLQ-----	36
JF946774	MASDGVSSSTSTPMISVDETTAAASVP-----NSSVSVPLQ-----	36
JF946775	MSSNDLSSGTSTPMVSVDETTATSSAP-----NPSVSAPIQ-----	36

\* \* \* \* \*

AF345894	-----TSAPAAS---EPVISQVQTLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQSQ-----	77
AF345895	-----TSAPAAS---EPVISQVQTLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQSQ-----	77
AY572458	-----ANAPAAS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQ-----	77
HM352767	SEPASSAPASTPVAS---EPVLSQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARKGY	99
AF345892	-----ASTPAAS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQIRQARGETARQNH	85
AF438521	-----VSAPIVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQEEAARRGY	85
FJ619187	-----VSAPVAS---EPVVSQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAHEEAARRGY	85
DQ003336	-----V-VSAVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQEEAARRGY	85
AF491930	-----VSVPAVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQIRQAQEEAARRGY	85
AF491931	-----VSAPVVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
FJ619188	-----ASVPAAS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQEEAARRGY	85
AB045371	-----VSVPAIS---EPVISQVQSIAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAHEEAARRGY	85
FN430678	-----VSAPIVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQIRQAQGEAARRGY	85
FR694922	-----VSAPIVS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQIRQAQGEAARRGY	85
HM125158	-----MSAPMVS---GPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQIRQAHEEAARRGY	85
HM125156	-----TSAPVVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPDLHGRLTNEQLRQSQDEAVRRGH	85
HM125157	-----VSAPVAS---EPVISQVQSVAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQDEAARRGY	85
AF438522	-----VSAPVVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
AF495382	-----VSAPVVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
EU314950	-----VSAPVVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
HM125159	-----VSAPAVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPDLHGRLTSVQMRQAQDNAARRGY	85
EU708018	-----ASVPVAS---GPVVSQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
AF491929	-----ASAPAVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQGEAARRGY	85
AF345893	-----PSAPAVS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAR-----	77
NC003468	-----ASAPTAS---EPVISQVQSLAPLVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQNEAAMQGY	103
JF946773	-----ASSPASSPPEPVISQVQTVAPLVSGFDPNLHGRLSNEQMRRAQEESIRKGF	88
JF946774	-----ASSPASSPPEPVISQVQTVAPLVSGFDPNLHGRLSNEQMRRAQEESIRKGF	88
JF946775	-----ASSPASSPPEPVISQVQTVAPLVSGFDPNLHGRLSSEQMRRAQEESIRKGF	88

\* \* \* \* \*

AF345894	-----SGAARS--AGMNSNPFETGAAYSGAPRASIGSYLTFPESGSASEPNSQ	123
AF345895	-----SGATRS--AGMNSNPFETGAAYSEAPRASMGSYLTFPESGSASEPNSQ	123
AY572458	-----SGATSQDRVSMTSNPFETGTAYSRGPRASMGYPYLNFPESGSASEPNSQ	125
HM352767	EEGSRQRQRSTSSAPQVNYASINSNPFETGIAYSLAPHVGMGPYLSFPESGNASEPNSH	159
AF345892	AEGSHSDQRSTSTTHHDYTGVNSNPFETGTAYGNVPQMSMGSYLTFPESGSASEPNAQ	145
AF438521	EEGSRPNQRILPNTGAYNNYASMNSNPFETGTAYSEAPRMNMGYPYISSGYEGTSEPSAQ	145
FJ619187	EEGSRPNQRVLPSTGAYSNYASMNSNPFETGTAYSEAPVMNMGYPYISS--IGSSEPNAQ	143
DQ003336	EEGSRPNQRVLPSTGAYNNYASMNSNPFETGTAFSDAPPASMGYPYIFSSAGGPSEPNAQ	144
AF491930	EEGSRQRQRVLPSTSAHYNYASINSNPFETGTAYSDAPPVSMGPYIFSSAGSSSEPNAQ	145
AF491931	EEGSRPNQRVLPITSTYNNYASMNSNPFETGSASFSEAPVNMGPYPIISSAATSSSEPNAQ	145
FJ619188	EEGSRPNQRVQPTTSAHYNYASMNSNPFETGTAFSEAPQNMNMGYPYPTFSSSGTSPSEPSAQ	145
AB045371	EEGSRPNQRVMPSTTSAHYNYASMNSNPFETGTAFSEAPVSMGPYPTFSSSGTSPSEPSAQ	145
FN430678	EEGSRPNQRVLPSTTYANYASMNSNPFETGTAFSEAPRVNMGYPYPTSSSSGTSPSEPSAQ	145
FR694922	EEGSRPNQRVLPSTTYANYASMNSNPFETGTAFSEAPRVNMGLYPTSSSSGTSPSEPSAQ	145
HM125158	EEGSRPNQRVLPSTSAHINYASMNSNPFETGTAFSEAPIMSMGPYPIFSFGSTSPSEPSAQ	145
HM125156	EEGSRPNQRVLPSTSAHLNYAGMNSNPFETGFASFSSAPQVNMGPYPTFSSSEATGQPSAQ	145
HM125157	EEGLRPNMRVLPSTGAHENYASMNSNPFETGTAFSGSPRVNMGYPYPTFSSSGTSPSEPSAQ	145
AF438522	EEGSRPNQRFTPTSTVALNSYASMNSNPFETGTAYSDAPQINMGYPYPTFSGSGTSPSEPSAQ	145
AF495382	EEGSRPNQRFTPTSTVALNSYASMNSNPFETGTAYSDAPQINMGYPYPTFSGSGTSPSEPSAQ	145
EU314950	EEGSRPNQRFTPTSTVAFNNYAGMNSNPFETGTAYSEAPQNMNMGYPYPAFSGSSSEPNAQ	145
HM125159	EEGSRPNQRFTPTSTAYNNYASMNSNPFETGTAYSEAPQMSMGPYPTFSGSGSPSEPSAQ	145
EU708018	EEGSRNARSTSTAAHD IYASINSNPFETGTAYGGAPRVSLGPYPAFFSGGSPSEPSAQ	145
AF491929	EAGSRHNQRSALSTAAQNNYASINSNPFETGTAYGGAPLESFGTYPTFFGGSSSEPNSQ	145
AF345893	-DGTR-----QVSSINSNPFETGNAYSGAPLVGMGLYPSFSGSGSASEPNSQ	124
NC003468	EEGSRPNRPLPSTTAHNDYASMNSNPFETGTAYGGAPRVSFSGYPTFPGSGSASEPNSQ	163
JF946773	EDARRARMASASTSLVSPYPVITSNPFETGYAYGQPSNASIG--YQSHLTGTSSEPSAQ	146
JF946774	EDARRARMTSASTSLVSSYPVITSNPFETGYAYGQPSNSSIG--HQSHILGTSSEPSAQ	146
JF946775	EDARRARMTSAPTSLVSTPYVITSNPFETGYAYGQPSNASIG--QQSYTSGTSGEPNSQ	146
	***** * .*	
AF345894	RIFPQQHGVNPSAHASDLVPRQVIPGGNAGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	183
AF345895	RIFPQQHGVNPSAHASDLVPRQVIPGGNAGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	183
AY572458	RIFPLQHGVPNSAHASDLVPRQVPTSGGNAGTPFTLGNRMPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	185
HM352767	RVFPQQHGVNPSAHASDLAPTTVASGGNAGTPFTLGNRAPRNVTSNAGMRRRLDSTGLK	219
AF345892	RIFPQQHGVPNSAHGADLMASQPNAGNNVGTFTLGNRAPRNVTSNAGGIRRRRLDSIGLR	205
AF438521	RIFPVQHGVPSSHDANLVSQQVTVGGNSGSPFTLGNRAPRNVTSNAGMRRRLDSMSLE	203
FJ619187	RIFPIQYGVSPSAHDNLTPQQVAVGGNAGSPFTLGNRARSNVTSNTGGMRRRLDSMSLK	204
DQ003336	RIFPIQHGVPNSAHADANLVANQASAGGGSGTPFTLGNRAPRNVTSNTGGMRRRLDSVSLK	205
AF491930	RIFPTQHGVPNSAHADANLVANQANTGGGSGTPFTLGNRAPRNVTSNTGGMRRRLDSVGLK	205
AF491931	RIFPVQYGVSPSSHDVNLAVNQVNSERSGGGTPFTLGNRAPRNSAASNIGMRRRLDSVGLK	205
FJ619188	RIFPVQHGVPNSAHADANLVVRQAAAGSSGTPFTLGNRAPRNVTSNTGGMRRRLDSIGLK	205
AB045371	RIFPQLQGVNPSAHASDLTAQSVAGSGVGTFTLGNRAPRNVASNTGGMRRRLDSIGLK	205
FN430678	RIFPIQHGVPSTHDANLVAQQTNAVSNNGTPFTLGNRAPRNVTSNTGGMRRRLDSTGLR	205
FR694922	RIFPIQHGVPSTHDANLVAQQTNAVSNNGTPFTLGNRAPRNVTSNTGGMRRRLDSTGLR	205
HM125158	RIFPIQHGVPNSAHGAEILPQQAGSG--NAGSPFTLGNRAPRNVASNMGGMRRRLDSVGLR	204
HM125156	RIFPVQHGVPSSHDASLTQQTAVTAGANQGTFTLGNRAPRNSVAPNTGGMRRRLDSIGLR	205
HM125157	RIFPQLQGVNPSAHDSSTLAQQTAVTAGDGGTPFTLGNRAPRNSVASNTGGMRRRLDSVGPK	205
AF438522	RVFPQYGVNPSAHGADPVQNTTAGGNVGTFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	205
AF495382	RVFPQYGVNPSAHGADPVQNTTAGGNVGTFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	205
EU314950	RIFPPQYGVNPSAHADNLVQNTNAGGNAGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	205
HM125159	GVFPQQHGVPSSHTADLVQSQ--AGGNTGIPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSMNLK	203
EU708018	RIFPQQHGVPNSAHASDLAPNQV--CGNTGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	203
AF491929	RIFPQQHGVPNSAHASDLAPNQV--CGNTGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSIGLK	203
AF345893	RIFPQQHGVNPSAHASDLAPNQVTSGGNAGTPFTLGNRAPRNVASNTGGMRRRLDSVGLK	184
NC003468	RIFPQQHGVNPPAHASDLVPHQATSGGNTGTPFTLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSVGLK	223
JF946773	RIFPVQQGVPNSAHDSNLRPDQSTIEGAQVVPFSLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSSGLK	206
JF946774	RIFPVQQGVPNSAHDSNLRPDQSTIEGAQVVPFSLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSSGLK	206
JF946775	RIFPVQQGVPNSAHDSNLRPDQSTIEGAQVVPFSLGNRAPRNVNTANTGGMRRRLDSSGLK	206
	*** ** .*** ** .*** ** .*	

图 3 ASPV CP 基因氨基酸序列多变区多重比对

Figure 3 Alignment of the amino acid sequences of high high variability domain of coat protein ASPV

表 2 KL1, KL9, Y3 CP 基因与 ASPV 其它分离物氨基酸同源率比对

Table 2 Identities of CP amino acid sequences KL1, KL9 and Y3 with other isolates

序列号	KL1 同源率	KL9 同源率	Y3 同源率	序列号	KL1 同源率	KL9 同源率	Y3 同源率
Accession No.	Identity (aa)	Identity (aa)	Identity (aa)	Accession No.	Identity (aa)	Identity (aa)	Identity (aa)
NC_003462	70.3	71.0	71.3	AF438522	71.7	71.0	71.0
AB045371	71.9	71.4	71.4	EU314950	72.2	71.4	71.7
DQ003336	71.4	70.9	70.7	EU708018	72.2	72.7	72.9
AY572458	69.9	71.2	71.2	HM352726	71.2	72.0	72.0
AF345892	70.2	71.2	70.9	HM125156	70.4	70.2	70.4
AF345893	68.2	68.2	68.4	HM125157	72.9	72.2	72.2
AF345894	71.4	71.2	71.2	HM125158	70.2	70.4	70.4
AF345895	71.7	71.0	70.9	HM125159	71.7	70.9	70.9
AF491929	72.9	74.2	74.4	FJ619187	70.8	70.9	71.3
AF491930	73.7	72.9	72.9	FJ619188	72.7	72.7	73.2
AF491931	72.2	71.4	71.4	FR694922	70.4	70.2	70.2
AF495382	71.2	70.4	70.4	FN433599	70.9	70.7	70.7
AF438521	71.9	71.7	71.7				

### 1.4.2 系统进化分析

我们对 3 个 ASPV 新疆分离物 CP 基因和 GenBank 上发布的 25 个 ASPV 分离物 CP 基因的氨基酸序列构建了系统进化树(图 4), 结果显示 25 个 ASPV 分离物分成明显的 3 个类群, I 类群是以苹果为寄主, 在该类群中有 4 个进化分支, AB045371 (日本 Japan)、HM125157 (中国 China)、AF491931 (波兰 Poland)、DQ003336 (捷克 Czech Republic)及 AF491930 (波兰 Poland)形成紧密的一簇, 构成一个分支; FJ619188 (波兰 Poland)与 HM125156 (中国 China)构成第二个分支; AF438521 (波兰 Poland)、FJ619187 (中国 China)、HM125158 (中国 China)、FN430678 (印度 Indian)、FR694922 (印度 Indian)形成一簇, 构成第三分支, EU314950 (中国 China)、AF438522 (波兰 Poland)和 AF495382 (波兰 Poland)构成了第四分支。II 类群是以梨为寄主, 由四个分支构成, 第一分支由 HM352762 (中国 China)和 AF345892 (波兰 Poland)构成; 第二分支由 EU708018 (中国 China)和 AF491929 (波兰 Poland)构成; 第三分支由 AF345893 (波兰 Poland)和 NC003462 (德国 Germany)构成; AY572458 (巴西 Brasil)、AF345894 (波兰 Poland)和 AF345895 (波兰 Poland)形成一簇, 构成第四分支。ASPV-KL1、ASPV-KL9 及 ASPV-Y3 构成第III类群, 寄主为新疆栽培的梨品种。

## 2 讨论

本研究扩增的 ASPV 分离物的 CP 基因分别来

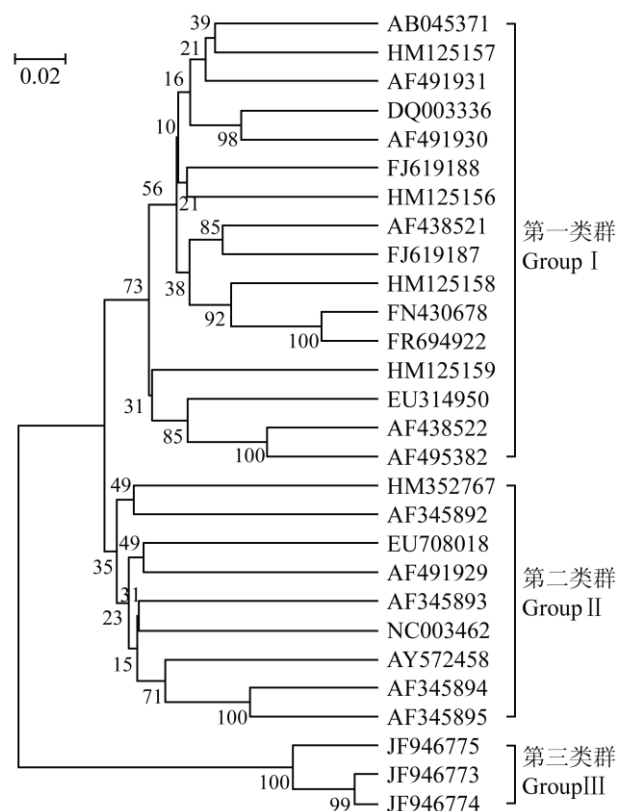


图 4 基于 ASPV CP 基因氨基酸序列构建系统树

Figure 4 Phylogenetic tree of ASPV isolates constructed with the complete coat protein-coding aa sequences

自库尔勒香梨和鸭梨。由于 ASPV 存在复杂的变异, 会对 ASPV CP 基因的扩增造成一定困难。本实验

使用的 PS/PA 是有效扩增 CP 基因完整编码区的引物。通过大量样品扩增发现, 库尔勒香梨、鸭梨、砀山梨这三个品种的样品中, 库尔勒香梨和鸭梨均扩增出了预期目的片段, 测序结果证明是 ASPV CP 基因。本研究扩增出了库尔勒香梨 KL1 和 KL9 及鸭梨 Y3 的 3 个分离物 CP 基因, 基因片段大小均为 1 194 bp, 编码 397 个氨基酸, 分子量约为 42 kDa。将序列提交至 GenBank, 登录号分别为 JF946775、JF946773、JF946774。而砀山梨的 6 个样品均没有扩增出目的片段, 但用 ASPV 复制酶保守区引物扩增出了目的片段, 并通过目的片段测序证明这些样品均感染了 ASPV。因此, 应该在不同生态环境和地理区域采集更广泛的寄主研究外壳蛋白基因的分子变异, 以便能系统的了解 ASPV 外壳蛋白的变异特征及株系分化情况。

实验结果显示, 我们扩增得到的 3 个 ASPV 分离物的 CP 基因与 GenBank 上登录的序列的氨基酸的同源率一般均在 70% 左右。aa1-177 氨基酸序列出现较大变异, 为高变区, 而后 130 个氨基酸高度保守。外壳蛋白在保护病毒核酸的同时, 在病毒侵染过程中还起着识别寄主的作用, 而蛋白质功能位点往往是由较短的序列片段组成, 此区域序列一般具有较强的保守性(Meng et al., 1998; Hull, 2001)。对其氨基酸序列位点扫描发现, CP 基因的识别位点主要分布在高度保守区, 分别为: Cys 位于 aa292, ProProXXTrp 位于 aa309-313, AryXPheAspPhe 位于 aa325-329 及 Pro 位于 aa349, 这些位点是外壳蛋白基因的活性和识别位点, 可能还执行其它重要的生理功能。因此, 有关位点及变异区域的研究, 对搞清 ASPV CP 基因的结构功能及其变异特征具有重要的意义。

分子生物学技术在植物病毒分类及病毒株系鉴定中的应用, 使得界定植物病毒的地位或株系种类更具准确性和科学性(Li et al., 2006)。随着分子生物学技术的不断进步, 利用病毒序列来研究病毒的演化已成为可能, 用其构建系统进化树可以准确了解病毒株系的亲缘关系及演化趋势(Chachulska et al., 1997)。对 ASPV 来说, 由于目前报道的全长基因组序列仅有 4 条, 对该病毒的分类及株系分化带来了一定困难, 而病毒的 CP 基因在寄主症状、病毒长距离和细胞间运转、病毒的介体传播等方面起着重要作用, 同时, 病毒间 CP 基因的同源性比较分析是病毒株系划分的主要依据之一, 因此, 本实验

对 3 个新疆分离物的 CP 基因与 GenBank 上登录的 25 个完整的 CP 基因氨基酸序列进行了系统进化分析, 结果显示, 这些分离物分类聚集的趋势十分明显, 呈现一定的寄主相关性, 该结果与李丽丽等(2010)报道的结果相同。本试验研究结果显示, 28 个分离物共分为 3 个类群, 一是以苹果为寄主的类群, 二是以梨为寄主的类群, 三是以新疆栽培的梨品种为寄主的类群。图 4 显示, 新疆栽培的梨品种自成一个类群, 第一和第二类群中小的进化分支的形成并不具有一定的规律性, 这可能是由于生态环境的改变, 引起了病毒外壳蛋白基因的变异。从表 1 可以看出, 25 个分离物大多为中国和波兰分离物, 这给进化关系的分析带来一定局限性。病毒也同其它生物一样, 由于自然选择压力的存在, 当自然环境改变时, 为了适应环境而不断地发生变异, 基因组结构和序列能真实反映植物病毒的变异及进化关系(古勤生等, 2008), 如能将不同地理来源, 不同气候条件的分离物的 CP 基因与基因组的其它序列信息结合起来分析, 则会使 ASPV 分类更加全面。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

##### 3.1.1 植物材料

本实验所用植物材料均采自新疆库尔勒沙依东园艺场香梨园, 采集库尔勒香梨、鸭梨和砀山梨的一、二年生枝条, 并放入 4℃ 保存备用。

##### 3.1.2 主要试剂和菌株

Taq DNA 聚合酶购自广东东盛生物科技有限公司; Ribonuclease Inhibitor、dNTPs、IPTG、X-Gal 购自上海生工生物技术有限公司; DNA Marker D514A、PMD19-T vector 均购自大连宝生物有限公司; 反转录酶 M-MLV、限制性内切酶购自 Fermentas; 其它常规试剂均为国产分析纯。菌株 *E. Coli* DH5α 由石河子大学农学院果树生物技术实验室保存。

##### 3.1.3 引物设计

根据 GenBank 上已提交的 ASPV 全长基因组序列(登录号: NC\_003462), 通过 Primer 5.0 软件设计扩增 CP 基因的全序列引物。引物序列为: 上游引物(PS) 5'-CCCATTAGGTTAGGGTGTAGTTGCT-3' (位于 nt7829-7853); 下游引物(PA) 5'-ATGAAAGAAACACACACATAGCCGC-3' (位于 nt9249-9273)。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

## 3.2 方法

### 3.2.1 总 RNA 的提取

利用皮层为材料提取总 RNA, 具体参考何梅等(2004)库尔勒香梨总 RNA 快速提取方法。

### 3.2.2 苹果茎痘病毒的 RT-PCR 扩增

cDNA 第一链的合成: 反转录体系为 25  $\mu$ L, 含总 RNA 5  $\mu$ L、DEPC 水 9.5  $\mu$ L、反向引物 1  $\mu$ L; 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 5 min; 再依次加入 M-MuLV 5 $\times$  buffer ( $Mg^{2+}$  40 mmol/L) 5  $\mu$ L、dNTPs (10 mmol/L) 2.5  $\mu$ L、RNasin (40 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L; 42 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 最后加入 M-MuLV 1  $\mu$ L。反应条件为 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 92 $^{\circ}$ C 灭活 4 min, 然后置于冰上进行 PCR 反应或 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

PCR 扩增 PCR 反应体系: 10 $\times$  Buffer 2.0  $\mu$ L (含  $Mg^{2+}$ )、dNTP 0.4  $\mu$ L、引物 PS/PA (20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L、cDNA 2.0  $\mu$ L、Taq 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 32 次循环: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

### 3.2.3 PCR 产物电泳检测

取上述 PCR 产物 5  $\mu$ L, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶, 溴化乙锭(EB)染色, 进行电泳鉴定, 电泳缓冲液为 1 $\times$  TAE, 电压 150 V, 紫外灯下观察实验结果并照相记录。

### 3.2.4 目的片段克隆、测序和序列分析

PCR 产物经切胶回收纯化后与 PMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 通过抗性筛选, 将质粒 PCR、酶切鉴定都正确的插入片段的菌液寄往上海生工生物技术有限公司进行测序。测序结果同源性分析采用 DNAMAN 软件, 氨基酸的多重比对使用 CLUSTAL-X (version 1.81)分析软件, 系统进化树采用 CLUSTAL-X (version 1.81)和 MEGA (version 4.1)分析软件。

## 作者贡献

刘娜是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 同时完成数据和试验结果分析, 论文初稿的写作; 牛建新是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由国家自然科学基金资助项目(30360066); 国家科技攻关计划引导项目(2003BA546C); 石河子大学自然科学

与技术创新项目(ZRKC200707)的资助。作者感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

## 参考文献

- Chachulska A.M., Chrzanowska M., Robaglia C., and Zagorski W., 1997, Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3'-terminal sequences of the potato virus Y genome, *Arch. Virol.*, 142(4): 765-779
- Gu Q.S., Tian Y.P., Peng B., Liu L.F., Deng C.L., Liang X.M., and Meng J., 2008, Molecular analysis of three cucurbit viruses based on coat protein gene sequences, *Zhiwu Bingli Xuebao (Acta Phytophylacica Sinica)*, 38(4): 357-363 (古勤生, 田延平, 彭斌, 刘丽锋, 邓丛良, 梁新苗, 孟娟, 2008, 基于为壳蛋白基因序列对3种葫芦科作物病毒的分子分析, *植物病理学报*, 38(4): 357-363)
- He M., Li H.S., Zhao Y., Niu J.X., and Ma B.G., 2004, A method of rapidly extracting total RNA from Korla Aroma pear, *Shihezi Daxue Xuebao (Journal of Shihezi University (Natural Science))*, 22(6): 474-476 (何梅, 李海生, 赵英, 牛建新, 马兵钢, 2004, 库尔勒香梨总RNA快速提取方法, *石河子大学学报(自然科学版)*, 22(6): 474-476)
- Hull R., ed., 2001, *Matthews' plant virology*, Fourth Edition, Academic Press, London and California, pp.758
- Jelkmann W., 1994, Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat prote in gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses, *Journal of Virology*, 75(7): 1535-1542
- Li L.L., Dong Y.F., Zhang Z.P., Zhang Z.H., Fan X.D., and Pei G.Q., 2010, RT-PCR detection and molecular variability of apple stem pitting virus, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 37(1): 9-16 (李丽丽, 董雅凤, 张尊平, 张志宏, 范旭东, 裴光前, 2010, 苹果茎痘病毒RT-PCR检测及分子变异分析, *园艺学报*, 37(1): 9-16)
- Li N., Wang X.F., Zhou G.H., and Dong J.G., 2006, Molecular Variability of the Coat protein gene of Potato virus Y from Tobacco in China, *Acta Virologica*, 50(2): 107-113
- Martelli G.P., and Jelkmann W., 1998, *Foveavirus*, a new plant virus genus, *Arch. Virol.*, 143(6): 1245-1249
- Meng B.Z., Pang S.Z., Forsline P.L., McFerson J.R., and Gonsalves D., 1998, Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to *Apple stem pitting virus*, *Journal of General Virology*, 79(8): 2059-2069
- Nemchinov L., Hadidi A., and Faggioli F., 1998, PCR-detection



of *Apple stem pitting virus* from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates, *Acta Hortic.*, 472: 67-73

Schwarz K., and Jelkmann W., 1998, Detection and characterization of European *Apple stem pitting virus* isolates of apple and pear by PCR and partial sequence analysis, *Acta Hortic.*, 472: 75-85

Yoshikawa N., Matsuda H., Oda Y., Isogai M., Takahashi T., Ito T., and Yoshida K., 2001, Genome heterogeneity of *Apple stem pitting virus* in apple trees, *Acta Hortic.*, 550: 285-290



5<sup>th</sup>Publisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>