

生物技术



3 个黑龙江烟区烟草花叶病毒分离物的全基因组序列测定与分析

姜瀚林¹, 郭兆奎², 刘永中², 万秀清², 刘文涛³, 李现道⁴, 李向东¹

1 山东农业大学, 植物保护学院植物病毒学研究室, 山东泰安岱宗大街61号 271018;

2 黑龙江省烟草科学研究所, 黑龙江哈尔滨哈药路17号 150076;

3 山东临沂烟草有限公司, 山东省临沂市兰山区北城新区智圣路3号 276003;

4 山东省烟草研究院, 山东济南舜华东路13号 250098

摘要: 为明确黑龙江烟区烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 分子株系和进化特征, 从哈尔滨和牡丹江感病烟草采集到 HEB1、HEB2 和 MDJ 三个样品, 通过 RT-PCR 扩增了其全基因组序列, 并进行了一致率、重组、系统发育和选择压力等分析。结果表明, 3 个分离物全长均为 6395 核苷酸 (GenBank 登录号分别为 MH595919、MH595920 和 MH595921)。HEB1 和 MDJ 与辽宁分离物 Beipiao (HE818412) 一致率最高, 分别为 98.9% 和 99.6%; HEB2 与云南分离物 Chuxiong1 (HE818417) 一致率最高, 为 97.1%。HEB1 是 MDJ 和 HEB2 的重组体。在根据全基因组序列构建的系统进化树中, TMV 分为 3 个组, 其中 HEB1 和 MDJ 均属 I (U1) 组, HEB2 属 II (Rakkyo) 组。TMV 的 4 个基因均处于负选择, 其中衣壳蛋白基因的选择压力最大。

关键词: 烟草花叶病毒; 基因组全序列; 系统发育分析; 重组分析

引用本文: 姜瀚林, 郭兆奎, 刘永中, 等. 3 个黑龙江烟区烟草花叶病毒分离物的全基因组序列测定与分析 [J]. 中国烟草学报, 2019, 25 (1)

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 是烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 的代表种, 是危害烟草、番茄和马铃薯的主要病毒。TMV 侵染烟草可引起花叶及疱斑等症状, 严重影响烟叶产量及品质。TMV 基因组为正义单链 RNA, 5'端有 m⁷G5' pppG 帽子结构, 3'端有 tRNA-like 结构, 基因组全长 6395 核苷酸 (nt) 左右^[1-3]。

明确 TMV 分子株系对指导病毒早期检测及防治有重大意义。谢扬军等^[4] 对国内 8 个主要产烟省的 TMV 分离物进行株系划分, 证明我国 TMV 株系划分存在地理隔离。杨恭等^[5] 测定了 TMV 中国 U1 株系分离物及弱毒番茄分离物的全基因组序列。邵碧英等^[6] 测定了福建 TMV 普通株系及两个弱毒突变体的全基因组序列。庞小静^[7] 等测定了 TMV 山西分离物的全基因组序列。目前还没有关于黑龙江 TMV 烟草分离物全基因组序列测定及分析的报道。本文测

定了 3 个黑龙江烟草 TMV 分离物的全基因组序列, 并与 GenBank 中 26 个 TMV 分离物进行了一致率、重组、选择压力和系统发育等分析, 为黑龙江烟区 TMV 检测及抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

发病烟草样品采自黑龙江省哈尔滨市和牡丹江市, 3 个样品分别命名为 HEB1、HEB2 和 MDJ。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。植物总 RNA 提取试剂盒 Transzol、DNA 凝胶回收试剂盒等均购自北京全式金公司; Taq DNA 聚合酶购自南京诺唯赞公司, M-MLV 反转录酶、pMD18-T 克隆载体、LA Taq DNA 聚合酶和末端转移酶购自 TaKaRa 公司; Super ScriptTM IV 反转录酶购自 Invitrogen 公司。其他生化试剂及普通化学试剂均为进口或国产分析纯。

基金项目: 黑龙江省烟草公司项目 (HN201703), 山东省烟草公司项目 (KN238-201602), 泰山学者建设工程 (TS201712023)

作者简介: 姜瀚林 (1993—), 硕士研究生, 主要从事植物病毒学研究, Tel: 0538-8242523, Email: jianghanlinhl@163.com

通讯作者: 李向东 (1969—), Tel: 0538 8242523, Email: xdongli@sdau.edu.cn

收稿日期: 2018-07-23; **网络出版日期:** 2018-11-30

1.2 实验方法

1.2.1 扩增策略及引物合成

使用 DNAMAN (version7) 对 GenBank 中的

TMV 序列进行比对, 选择保守片段设计引物, 分两段进行全序列扩增。引物序列详见表 1。

表 1 TMV 全基因组扩增引物

Tab.1 Oligonucleotide primers used to amplify the complete genome of TMV

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 /°C	扩增片段起始位点或大小 /nt
TMV1-F [★]	CCAACAACAACAACAACAAC	58	58 - 3555
TMV1-R [★]	GCAATCAAAATTATTCATCATGG	57	
TMV2-F [★]	CCAAATTGGAAGTTGACGAGGTG	65	2926 - 6395
TMV2-R [★]	TGGGCCCTACCGGG	64	
R-390 [★]	CCCTACGGATCATTGACTTATGAC	61	399
R-371 [★]	TAGAACTGGAATATCTGATGATGC	57	340
Q _T [▲]	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAG CTTTTTTTTTTTTTTTTT	60	
Q ₀ [▲]	CCAGTGAGCAGAGTGACG	55	
Q ₁ [▲]	GAGGACTCGAGCTCAAGC	55	

注: ★根据 NCBI 中 TMV 保守区域设计的特异引物; ▲用于 5'-RACE 的引物。

Note: ★ Specific primers were designed according to the conservative regions of TMV from NCBI. ▲ Primers used for 5'-RACE.

1.2.2 植物总 RNA 提取、RT-PCR 扩增及 5' RACE

利用 Transzol 试剂盒提取植物总 RNA, M-MLV 反转录酶进行反转录, 分两段扩增 5'端以外的 TMV 基因组片段。依照 Elizabeth 等^[8]的 5' RACE 扩增 TMV 5'端基因组。

1.2.3 克隆及序列测定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 紫外灯下切取 3498 bp 和 3470 bp 处胶条。使用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 回收 PCR 产物并连接

pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞后, 蓝白斑筛选挑取白色单菌落, PCR 验证阳性后选取 3 个克隆送北京华大基因公司测序。

1.2.4 核苷酸序列一致率分析

使用 DNASTAR 软件包的 Seqman 对序列进行拼接, 通过 MegAlign 与 GenBank 中 26 个 TMV 分离物(表 2) 序列进行比对, 分析 3 个分离物全基因组在氨基酸和核苷酸水平与参比序列的一致率。

表 2 本文分析用的 29 个 TMV 分离物序列号及来源

Tab.2 Accession number, host and geographical origin of the 29 TMV isolates analyzed in the paper

分离物名称	序列号	寄主来源	地理来源
HEB1	MH595919	Tobacco	China
HEB2	MH595920	Tobacco	China
MDJ	MH595921	Tobacco	China
Jimo	HE818443	Tobacco	China
TMV152	AF395129	—	China
Xingren1	HE818449	Tobacco	China
PetTW	EF392659	Petunia	China

续表 2

分离物名称	序列号	寄主来源	地理来源
Beipiao	HE818412	Tobacco	China
China U1	AF165190	—	China
Chuxiong1	HE818417	Tobacco	China
Fujian U1	AF395127	Tobacco	China
Bean	AJ011933	Broad bean	China
Xunyang	HE818452	Tobacco	China
Shenyang	MG516107	Tobacco	China
Yihan1	HE818445	Tobacco	China
Hechi	HE818426	Tobacco	China
Yongren1	HE818457	Tobacco	China
Zigui	HE818425	Tobacco	China
Songtao1	HE818441	Tobacco	China
Korean	X68110	Tobacco	Korea
vulgare	V01408	Tobacco	Germany
USA	NC001367	—	America
Ancestor	KF972430	—	Spain
masked	AF273221	Tobacco	America
Rakkyo	D63809	Rakkyo	Japan
Ohio V	FR878069	Tomato	America
WT-L3	KF972430	—	Spain
Tor2-L1	KF972434	—	Spain
WT-L2	KF972429	—	Spain

注：“—”表示寄主未知。

Note: ‘—’ means no host information was available.

1.2.5 重组分析

将序列用 CLUSTAL X1.81 软件进行比对, 使用 RDP (version4.95) 软件包进行重组分析。通过 RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MAXCHI、CHIMAERA、SISCAN 和 3Seq 七种算法分析。当四种以上算法支持重组, 且 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ 时, 该分离物可认定为存在重组。

1.2.6 系统发育分析

以 ToMV queensland 分离物为外组, 选取 GenBank 中 26 个 TMV 分离物, 通过 MEGA7 中 CLUSTAL W 模块进行序列对比, 以邻近法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 自展值设置为 1000 并去掉小于 50% 的分支。同时使用 MEGA7 计算组内距离和组间距离。

1.2.7 选择压力分析

使用 MEGA7 中 Pamilo-Bianchi-Li 算法, 分别计算各蛋白的 d_N/d_S 值, 若 $d_N/d_S > 1$, 说明存在正选择; 若 $d_N/d_S = 1$, 说明存在中性选择; 若 $d_N/d_S < 1$, 说明存在负选择。

2 结果与分析

2.1 分离物 HEB1、HEB2 和 MDJ 基因组结构

HEB1、HEB2 和 MDJ 3 个分离物基因组 RNA 长度均为 6395 nt (GenBank 登录号分别为 MH595919、MH595920 和 MH595921)。分离物 HEB1 基因组 RNA A、C、G、U 的含量分别为 29.1%、19.0%、

24.1% 和 27.7%, HEB2 为 29.2%、19.0%、24.1% 和 27.8%, MDJ 为 29.1%、18.9%、24.1% 和 27.8%。

3 个分离物基因组均包含 4 个开放阅读框 (ORF)。ORF1 起于 69 nt, 止于 3419 nt, 编码分子量为 126 kDa 的蛋白, 终止密码子 TAG 可被通读至 4919 nt 形成 ORF2, 编码分子量 183 kDa 的通读蛋白, 两种蛋白共同行使依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶功能 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。ORF3 起于 4903 nt, 止于 5709 nt, 编码分子量 30 kDa 的移动蛋白 (movement protein, MP)。ORF4 起于 5712 nt, 止于 6191 nt, 编码分子量 17.6 kDa 的外壳蛋白 (coat protein, CP) (图 1)。

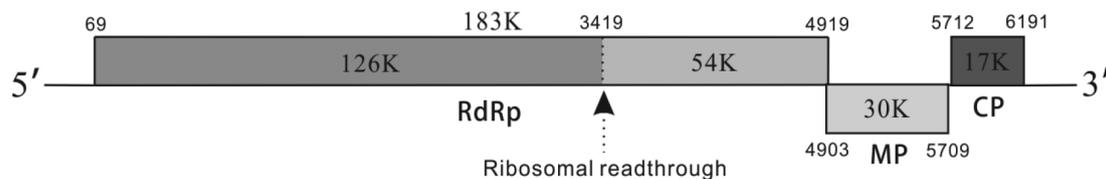


图 1 TMV 分离物 HEB1、HEB2 和 MDJ 基因组结构示意图

Fig.1 Genomic structure of TMV isolates HEB1, HEB2 and MDJ

2.2 核苷酸和氨基酸一致率分析

在全基因组水平上 (表 3), HEB1 分离物基因组与 Beipiao 分离物的核苷酸一致率最高, 为 98.9%, 与 petTW 分离物一致率最低, 为 85.8%。其中, ORF1/2 与 Beipiao 分离物一致率最高, 为 99.4%, 与 Ohio V 分离物一致率最低, 为 86.2%; ORF3 与 HEB2 分离物一致率最高, 为 98.0%, 与 petTW 分离物一致率最低, 为 81.6%; ORF4 与 MDJ 分离物一致率最高, 为 99.3%, 与 petTW 分离物和 Ohio V 分离物最低, 同为 89.1%。HEB2 分离物基因组与 Chuxiong1 分离物的核苷酸一致率最高, 为 97.1%, 与 petTW 分离物一致率最低, 为 85.4%。其中, ORF1/2、ORF3 和 ORF4 均与 Chuxiong1 分离物一致率最高, 分别为 97.0%、96.8% 和 97.9%, ORF1/2 与 Ohio V 分离物一致率最低, 为 86.0%, ORF3 和 ORF4 则与 petTW 分离物一致率最低, 分别为 81.1% 和 88.4%。MDJ 分离物基因组与 Beipiao 分离物的核苷酸一致率最高, 为 99.6%, 与 petTW 分离物一致率最低, 为 85.8%。其中, ORF1/2、ORF3 和 ORF4 均与 Beipiao 分离物一致率最高, 分别为 99.6%、99.4% 和 99.8%; ORF1/2 与 Ohio V 分离物一致率最低, 为 86.2%, ORF3 与 petTW 分离物一致率最低, 为

81.3%, ORF4 与 petTW 分离物和 Ohio V 分离物最低, 同为 88.9%。

在氨基酸水平上 (表 4), HEB1 分离物 183 kDa 和 MP 均与 MDJ 分离物的氨基酸一致率最高, 分别为 98.8% 和 99.6%, 183 kDa 与 petTW 分离物和 Ohio V 分离物氨基酸一致率最低, 均为 95.5%; MP 与 petTW 分离物氨基酸一致率最低, 为 86.8%。HEB2 分离物 183 kDa 和 MP 均与 Chuxiong1 分离物氨基酸一致率最高, 分别为 99.0% 和 97.5%; 183 kDa 与 petTW 分离物和 Ohio V 分离物一致率最低, 均为 95.7%, MP 则与 petTW 分离物一致率最低, 为 85.5%。MDJ 分离物 183 kDa 与 Beipiao 分离物和 TMV152 分离物一致率最高, 为 99.8%, 与 Ohio V 一致率最低, 为 96.2%; MP 与 Xingren1、Shenyang、Yihan1、Hechi 和 Songtao1 等 5 个分离物一致率最高, 均为 99.6%, 与分离物 petTW 一致率最低, 为 87.2%。三个分离物 CP 的氨基酸序列与其他分离物 CP 的氨基酸一致率相同, 除 petTW、Yihan1、Zigui、Rakkyo 和 Ohio V 五个分离物之外, 其他分离物一致率均为 100%; 与分离物 Ohio V 一致率最低, 为 97.5%。

2.3 分离物 HEB1、HEB2 和 MDJ 基因组重组分析

使用 CLUSTAL W 将 HEB1、HEB2 和 MDJ 与其他 26 个 TMV 分离物序列比对, 利用 RDP 分析可能重组情况。结果表明, 所用的 7 种软件都检测到 HEB1 存在重组事件 (表 5), 且其 P 值远远小于 $< 1.0 \times 10^{-6}$, 说明其基因组存在明显重组。HEB1 基因组 4780 nt -5462 nt 来自 HEB2 (minor parent), 其它部分来自 MDJ (major parent) (图 2)。

表 5 分离物 HEB1 重组分析
Tab.5 Recombination analysis of HEB1

软件名称	平均 P- 值
RDP	1.917×10^{-21}
GENECONV	8.266×10^{-20}
BootScan	1.450×10^{-19}
MaxChi	7.345×10^{-09}
Chimaera	1.168×10^{-07}
SiScan	3.644×10^{-11}
3Seq	1.966×10^{-13}



图 2 HEB1 重组模式示意图

Fig. 2 Recombination pattern of HEB1

2.4 系统进化关系

系统进化分析结果表明, 29 个 TMV 分离物聚为 3 个组 (图 3)。I (U1) 组最大, 包括 24 个分离物, 以 U1 分离物为代表。该组又可以分为 2 个亚组, 其中包括本研究中的 HEB1、MDJ 两个分离物以及福建 U1 株系分离物 (FujianU1)、TMV152 等共 13 个中国分离物聚为一个亚组, 说明中国大部分 TMV 基因组具有一定保守性。来自中国蚕豆、西德和美国的 11 个分离物形成第 2 亚组。第 II 组包括 HEB2、云南 chuxiong1 和日本 Rakkyo 三个分离物, 以 Rakkyo 分离物为代表。台湾 petTW 与美国 Ohio V 分离物聚为 III (Ohio) 组。三个组中都有中国分离物, 说明中国 TMV 分离物具有更高的遗传多样性。

为验证分组的可信度, 计算组内距离和组间距离 (表 6)。结果表明 I (U1) 组内遗传距离为 0.009, II (Rakkyo) 和 III (Ohio) 组内遗传距离较大, 分别

为 0.021 和 0.022, 但组间距离大于组内距离, 证明该系统进化树可信。

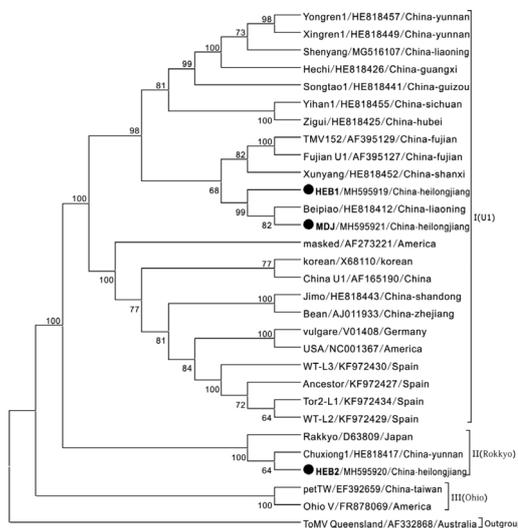


图 3 基于 HEB1、HEB2、MDJ 和其他 26 个 TMV 分离物构建系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of HEB1, HEB2, MDJ and other 26 TMV isolates

表 6 组内和组间遗传距离分析

Tab.6 Genetic distances within and between groups

分组	I (U1)	II (Rakkyo)	III (Ohio)
I (U1)	0.009 ± 0.004		
II (Rakkyo)	0.032 ± 0.012	0.021 ± 0.008	
III (Ohio)	0.091 ± 0.033	0.094 ± 0.034	0.022 ± 0.009

2.5 选择压力分析

126 kDa、54 kDa、MP 和 CP 四个蛋白 d_N/d_S 值均小于 1 (表 7), 表明 TMV 各蛋白处于负选择 (或称为纯化选择)。其中, 126 kDa 蛋白的 d_N/d_S 值最大, 而 54 kDa 的 d_N/d_S 值最小, 说明 126 kDa 受到的选择压最小而 54 kDa 受到的纯化选择压最大。

表 7 TMV 各蛋白选择压力分析

Tab.7 Selection pressure analysis of TMV proteins

蛋白	核苷酸多样性		
	d_N	d_S	d_N/d_S
126 kDa	0.0842	0.16707	0.50398
54 kDa	0.00266	0.13191	0.02017
MP	0.01335	0.16989	0.07858
CP	0.00749	0.12082	0.06199

表3 HEB1、HEB2 和 MDJ 与其他 TMV 分离物核苷酸的序列一致率
 Tab.3 Sequence identities between HEB1, HEB2 and MDJ with other TMV isolates at nucleotide level %

分离物名称	HEB1				HEB2				MDJ			
	通读 蛋白	移动 蛋白	衣壳 蛋白	全基 因组	通读 蛋白	移动 蛋白	衣壳 蛋白	全基 因组	通读 蛋白	移动 蛋白	衣壳 蛋白	全基 因组
HEB1	—	—	—	—								
HEB2	95.0	98.0	96.1	95.6	—	—	—	—				
MDJ	99.3	96.0	99.3	98.9	95.1	94.1	95.6	95.1	—	—	—	—
Jimo	97.8	95.3	97.4	97.5	94.8	94.3	96.5	94.9	98.2	97.8	98.1	98.2
TMV152	98.5	95.3	98.4	98.1	94.7	94.3	96.1	94.9	98.8	98.8	99.1	98.8
Xingren1	98.3	95.8	97.2	97.9	94.8	94.8	96.3	95.0	98.6	99.0	97.9	98.6
petTW	86.3	81.6	89.1	85.8	86.0	81.1	88.4	85.4	86.4	81.3	88.9	85.8
Beipiao	99.4	95.5	99.1	98.9	95.0	93.8	95.8	95.0	99.6	99.4	99.8	99.6
China U1	97.9	95.0	97.7	97.6	94.8	94.1	96.8	95.0	98.3	97.8	98.4	98.3
Chuxiong1	97.9	96.0	94.9	95.1	97.0	96.8	97.9	97.1	95.0	94.7	95.4	95.1
Fujian U1	98.5	95.4	98.4	98.1	94.6	94.4	96.1	94.8	98.8	98.9	99.1	98.8
Bean	97.8	95.0	97.7	98.0	94.8	94.1	96.8	94.9	98.2	97.5	98.4	98.1
Xunyang	98.5	95.5	98.1	97.8	94.9	94.1	95.8	94.9	98.8	99.1	98.8	98.8
Shenyang	98.4	96.0	97.0	97.9	94.9	95.0	96.1	95.1	98.6	98.8	97.7	98.6
Yihan1	98.2	95.5	96.5	97.8	94.7	94.6	94.7	94.8	98.6	99.0	97.0	98.5
Hechi	98.3	95.9	97.0	97.9	94.6	94.9	96.1	94.9	98.5	98.9	97.7	98.5
Yongren1	98.3	95.7	97.0	97.9	94.8	94.9	96.1	95.0	98.6	98.9	97.7	98.6
Zigui	98.2	95.3	97.0	97.8	94.8	94.3	95.1	94.8	98.5	98.8	97.4	98.5
Songtao1	98.5	94.9	97.9	98.0	94.9	93.9	96.1	94.9	98.8	98.4	98.6	98.7
Korean	98.0	95.0	97.7	97.6	94.8	94.1	96.8	94.9	98.3	97.8	98.4	98.3
vulgare	98.0	95.3	97.7	97.7	94.9	94.3	96.8	95.1	98.4	97.8	98.4	98.3
USA	98.0	95.3	97.9	97.7	94.9	94.3	96.8	95.1	98.4	97.8	98.4	98.3
Ancestor	97.9	95.0	97.7	97.6	94.9	94.1	96.8	95.0	98.3	97.5	98.4	98.2
masked	97.9	95.4	97.7	97.6	94.7	94.4	96.8	94.9	98.3	97.9	98.4	98.2
Rakkyo	93.9	97.8	94.9	94.2	95.9	95.4	96.8	96.0	94.1	93.3	94.4	94.0
Ohio V	86.2	84.3	89.1	86.3	86.0	83.9	88.6	86.1	86.2	83.8	88.9	86.3
WT-L3	97.9	95.0	97.7	97.6	94.9	94.1	96.8	95.0	98.3	97.5	98.4	98.2
Tor2-L1	97.9	95.0	97.7	97.6	94.9	94.1	96.8	95.0	98.3	97.5	98.4	98.2
WT-L2	97.9	95.0	97.7	97.6	94.9	94.1	96.8	95.0	98.3	97.5	98.4	98.2

表4 HEB1、HEB2和MDJ与其他TMV分离物氨基酸的序列一致率
 Tab.4 Sequence identities between HEB1, HEB2 and MDJ with other TMV isolates at amino acid levels

%

分离物名称	HEB1			HEB2			MDJ		
	通读蛋白	移动蛋白	衣壳蛋白	通读蛋白	移动蛋白	衣壳蛋白	通读蛋白	移动蛋白	衣壳蛋白
HEB1	—	—	—						
HEB2	97.6	97.1	100	—	—	—			
MDJ	98.8	99.6	100	98.3	96.7	100	—	—	—
Jimo	98.3	97.9	100	98.1	96.3	100	99.5	98.3	100
TMV152	98.6	97.9	100	98.6	95.9	100	99.8	98.3	100
Xingren1	98.3	99.2	100	98.1	97.1	100	99.5	99.6	100
PetTW	95.5	86.8	99.2	95.7	85.5	99.2	96.7	87.2	99.2
Beipiao	98.6	98.8	100	97.9	95.9	100	99.8	99.2	100
China U1	97.6	97.9	100	98.3	96.3	100	98.8	98.3	100
Chuxiong1	97.4	96.7	100	99.0	97.5	100	98.1	97.1	100
Fujian U1	98.1	98.3	100	98.1	96.3	100	99.3	98.8	100
Bean	98.3	97.5	100	98.8	95.9	100	99.5	97.9	100
Xunyang	98.3	99.6	100	98.1	96.7	100	99.5	100	100
Shenyang	98.3	99.2	100	98.8	97.1	100	99.5	99.6	100
Yihan1	97.9	99.2	98.3	97.7	97.1	98.3	99.0	99.6	98.3
Hechi	98.1	99.2	100	98.6	97.1	100	99.3	99.6	100
Yongren1	97.9	98.8	100	98.0	97.5	100	99.0	99.2	100
Zigui	98.3	98.8	98.3	98.8	96.7	98.3	99.5	99.2	98.3
Songtao1	98.1	99.2	100	98.0	97.1	100	99.5	99.6	100
Korean	97.6	97.9	100	98.3	96.3	100	98.8	98.3	100
vulgare	97.9	97.9	100	98.0	96.7	100	99.0	98.3	100
USA	97.9	97.9	100	98.3	96.7	100	99.0	98.3	100
Ancestor	98.1	97.5	100	98.0	96.3	100	99.3	97.9	100
masked	97.9	97.5	100	98.1	96.3	100	98.6	97.9	100
Rakkyo	97.1	94.6	98.3	97.8	95.9	98.3	97.9	95.0	98.3
Ohio V	95.5	87.6	97.5	95.7	86.4	97.5	96.2	88.0	97.5
WT-L3	98.1	97.5	100	98.0	96.3	100	99.3	97.9	100
Tor2-L1	98.1	97.5	100	98.0	96.3	100	99.3	97.9	100
WT-L2	98.1	97.5	100	98.0	96.3	100	99.3	97.9	100

3 讨论

3.1 TMV 株系划分及地理分布

以往的研究中 TMV 的株系划分主要依据生物学特性。谢联辉等^[9]将福建烟草 TMV 划分为普通株系 (TMV-C)、番茄株系 (TMV-Tom)、黄色花叶株系 (TMV-YM) 和环斑株系 (TMV-RS) 4 个株系, 王劲波等^[10]将山东烟区 TMV 划分为普通株系 (TMV^C)、坏死株系 (TMV^N)、黄化株系 (TMV^Y) 和环斑株系 (TMV^{SR}) 4 个株系。但 TMV 症状表型易受环境、寄主长势及侵染时间等条件影响^[11]。近年来, TMV 的鉴定和株系划分多依据核酸序列。Arguila 等提出了划分十字花科烟草花叶病毒属病毒的标准: 核苷酸序列一致率高于 95% 的为同一病毒, 一致率 85% ~ 95% 为密切相关的病毒。

Jakob 等^[12]对 Ohio V 株系进行全序列扩增并同其他 Tobamovirus 病毒比对 4 个 ORF 序列一致率, 判定 Ohio V 与台湾矮天牛 PetTW 分离物属于同一株系。丁铭等^[13]对云南的 5 个分离物扩增 CP 序列、秦西云^[14]等对云南的 38 个分离物进行了 CP 序列扩增和分析, 判定以上所有分离物均属 U1 株系。王莉爽等^[15]对贵州的 13 个 TMV 烟草分离物进行 CP 扩增, 发现云南分离物与贵州分离物 CP 序列一致率较高。刘天波等^[16]根据地理相关性将 TMV 分为 3 个种群。将其系统进化树与图 3 比对, 发现其 3 个种群基本对应 I (U1) 组的 3 个分支。刘金亮等^[17]根据 CP 序列将 TMV 分为 5 个组。黄金光等^[18]根据 TMV 的 CP 序列和症状特点将 TMV 分为 2 个株系。本文通过系统进化分析判断 TMV 分为 3 个组, 其中分离物 HEB1 和 MDJ 属于 U1 株系, 而且黑龙江烟区的 U1 株系与辽宁的 Beipiao 分离物聚类到一起, 形成独立的一个分枝。HEB2 属于 Rakkyo 株系, 说明日本 Rakkyo 株系可能已经传播到了黑龙江。此前, 该株系只在我国云南楚雄有发生。

3.2 TMV 进化分析

选择压力分析表明 TMV 四个蛋白均处于负选择, 说明寄主和环境等因素对 TMV 的选择压力很大, 不利于蛋白变化, 引起蛋白改变的突变体更容易被淘汰。与 126 kDa 蛋白和 MP 比较, CP 面临的选择压力最大, 这与蛋白氨基酸一致率的分析结果一致。在这 4 个蛋白中, 54 kDa 蛋白的 d_N/d_S 最小, 说明该蛋白承受的选择压力更大, 这可能与该蛋白是通过通读策略翻译产生的有关。

重组是病毒进化的重要途径之一, 可改变病毒致

病力^[19], 扩大寄主范围^[20~22], 有利于病毒适应当地环境。分离物 HEB1 存在重组信号, 为 MDJ 与 HEB2 重组, 说明 Rakkyo 株系可能与 U1 株系 TMV 分离物发生重组。

4 结论

本研究测定了黑龙江烟区 3 个 TMV 分离物的全基因组序列, 进行了一致率、重组、系统进化和选择压分析, 主要结论如下:

(1) HEB1、HEB2 和 MDJ 的基因组全长均为 6395 核苷酸。HEB1 和 MDJ 与辽宁分离物 Beipiao 一致率最高, 分别为 98.9% 和 99.6%; HEB2 与云南分离物 Chuxiong1 一致率最高, 为 97.1%。

(2) HEB1 是 MDJ 和 HEB2 的重组体。

(3) TMV 根据全基因组序列分为 3 个组, 其中 HEB1 和 MDJ 均属 I (U1) 组, HEB2 属 II (Rakkyo) 组。

(4) TMV 的 4 个基因均处于负选择, 其中衣壳蛋白基因的选择压力最大。

参考文献

- Zimmern D. The 5' end group of tobacco mosaic virus RNA is m7G5' ppp5' Gp.[J]. Nucleic Acids Research, 1975, 2(7):1189.
- Gallie D R, Feder J N, Schimke R T, et al. Functional analysis of the tobacco mosaic virus tRNA-like structure in cytoplasmic gene regulation.[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(18):5031-6.
- Goelet P, Lomonosoff G P, Butler P J, et al. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982, 79(19):5818-5822.
- 谢扬军. 烟草普通花叶病毒株系分化研究 [M]. 中国农业科学院硕士研究生论文, 2009.
XIE Yangjun. The research of TMV isolates differentiation [M]. Master Degree thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- 杨恭, 刘相国, 邱并生. 烟草花叶病毒 (普通株中国分离物) 及其弱毒疫苗 -N14(番茄株) 基因组侵染性 cDNA 核苷酸全序列测定与分析 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(4):437-442.
YANG Gong, LIU Xiangguo, QIU Bingsheng. Complete nucleotide sequences and genome structure of two Chinese tobacco mosaic virus isolates deduced from full-length infectious cDNA clones[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(4): 437-442.
- 邵碧英, 吴祖建, 林奇英, 等. 烟草花叶病毒及其弱毒株基因组的 cDNA 克隆和序列分析 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(4):296-301.
SHAO Biying, WU Zujian, LIN Qiying, et al. Genomic cloning and nucleotide sequence analysis of the cDNAs of Tobacco mosaic virus and its mild strains[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 296-301.
- 庞小静, 赵慧琪, 王德富, 等. 烟草花叶病毒山西番茄分离物的全基因组序列测定及分析 [J]. 中国蔬菜, 2017, 1(6):50-55.
PANG Xiaojing, ZHAO Huiqi, WANG Defu, et al. Complete Whole Genome Sequence Measure and Analysis of Tobacco mosaic virus Infecting Tomato in Shanxi[J]. China Vegetables, 2017, 1(6): 50-55.
- Scottolavino E, Du G, Frohman M A. 5' end cDNA amplification using classic RACE.[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2555-2562.
- 谢联辉, 林奇英, 谢莉妍, 等. 福建烟草病毒种群及其发生频率

- 的研究[J]. 中国烟草学报, 1994, 2(1): 25-32.
- XIE Lianhui, LIN Qiyang, XIE Liyan, et al. Studies on the population and occurrence frequency of tobacco virus diseases in Fujian [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 1994, 2(1): 25-32.
- [10] 王劲波, 王凤龙, 钱玉梅, 等. 山东烟区主要病毒的株系鉴定[J]. 中国烟草学报, 1998, 4(1): 24-32.
- WANG Jinbo, WANG Fenglong, QIAN Yvmei, et al. Identification of main viruses in Shandong tobacco region [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 1998, 4(1): 24-32.
- [11] Holmes F O. Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco [J]. *Phytopathology*, 1938, 28(8): 553-561.
- [12] Korbelen J, Willingmann P, Adam G, et al. The complete sequence of tobacco mosaic virus isolate Ohio V reveals a high accumulation of silent mutations in all open reading frames [J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(2): 387-389.
- [13] 丁铭, 方琦, 张丽珍, 等. 云南五个不同地区烟草花叶病毒外壳蛋白基因的序列比较[J]. 中国病毒学, 2004, 19(1): 76-78.
- DING Ming, FANG Qi, ZHANG Lizhen, et al. Comparison of the coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus isolated from different regions in Yunnan Province [J]. *Virologica Sinica*, 2004, 19(1): 76-78.
- [14] 秦西云, 卢训, 方琦, 等. 云南烟草中烟草花叶病毒株系比较与分析[J]. 中国烟草学报, 2013(6): 106-113.
- QIN Xiyun, LU Xun, FANG Qi, et al. Comparison of tobacco mosaic virus strains isolated from tobacco grown in different areas in Yunnan Province [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2004, 19(1): 76-78.
- [15] 王莉爽, 吴石平, 杨学辉, 等. 贵州烟草花叶病毒株系初探[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(12): 88-91.
- WANG Lishuang, WU Shiping, YANG Xuehui, et al. Preliminary Study on Tobacco mosaic virus strains in Guizhou province [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012, 40(12): 88-91.
- [16] 刘天波, 周志成, 彭曙光, 等. 基于全基因组编码区序列的烟草花叶病毒分子进化分析[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 87-92, 107.
- LIU Tianbo, ZHOU Zhicheng, PENG Shuguang, et al. Complete genomic coding sequence-based molecular evolutionary analysis of Tobacco mosaic virus [J]. *Plant Protection*, 2017, 43(5): 87-92, 107.
- [17] 刘金亮, 王凤婷, 魏毅, 等. 烟草花叶病毒南瓜分离物 CP 基因的克隆、序列分析及其原核表达[J]. 华北农学报, 2010, 25(5): 6-10.
- LIU Jinliang, WANG Fengting, WEI Yi, et al. Cloning, Sequence analysis and prokaryotic expression of the coat protein gene of Tobacco mosaic virus from Pumpkin Plant [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(5): 6-10.
- [18] 黄金光, 邓从良, 范在丰, 等. 烟草花叶病毒丁香分离物的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 215-220.
- HUANG Jinguang, DENG Congliang, FAN Zaifeng, et al. Isolation and Identification of Tobacco mosaic virus infecting *Syringa oblata* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(3): 215-220.
- [19] Worobey M, Holmes E C. Homologous Recombination in GB Virus C/Hepatitis G Virus [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2001, 18(2): 254-61.
- [20] Walt E V D, Rybicki E P, Varsani A, et al. Rapid host adaptation by extensive recombination [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90(3): 734-746.
- [21] Yin X, Zheng F Q, Tang W, et al. Genetic structure of rice black-streaked dwarf virus populations in China [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2505-2515.
- [22] Zhang C L, Gao R, Wang J, et al. Molecular variability of Tobacco vein banding mosaic virus populations [J]. *Virus Research*, 2011, 158(1/2): 188.

Determination and analysis of complete genomic sequence of three TMV isolates from tobacco producing areas in Heilongjiang

JIANG Hanlin¹, GUO Zhaokui², LIU Yongzhong², WAN Xiuqing², LIU Wentao³, LI Xiandao⁴, LI Xiangdong^{1*}

1 Laboratory of Plant Virology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong, China;

2 Heilongjiang Provincial Tobacco Research Institute, Harbin 150076, China;

3 Linyi Municipal Tobacco Company, Linyi 150076, Shandong, China;

4 Shandong Provincial Tobacco Academy, Ji'nan 250098, China

Abstract: To elucidate the molecular strains and evolution characteristics of *Tobacco mosaic virus* (TMV) from tobacco plants in Heilongjiang producing area, three samples from Harbin and Mudanjiang tobacco fields were collected and designated as HEB1, HEB2 and MDJ. Their complete genomic fragments were amplified via RT-PCR. Sequence identities, recombination, phylogenetic relationship and selection pressure were analyzed. Results showed that the full-length genome of isolates HEB1, HEB2 and MDJ were 6395 nucleotides (nt) (GenBank accession numbers MH595919, MH595920 and MH595921). HEB1 and MDJ had the highest identities of 98.9% and 99.6%, respectively, with isolate Beipiao (HE818412) from Liaoning province, while MDJ had the highest identity of 97.1% with isolate Chuxiong1 (HE818417) from Chuxiong of Yunnan province. HEB1 was a recombinant of isoaltes MDJ and HEB2. In the phylogenetic tree constructed with the complete genomic sequence, TMV was divided into three groups, among which HEB1 and MDJ belong to group I (U1) while HEB2 belong to group II (Rakkyo). All four proteins of TMV were under negative selection, with CP gene under the highest selection pressure.

Keywords: *Tobacco mosaic virus*; complete genomic sequence; phylogenetic analysis; recombination analysis

Citation: JIANG Hanlin, GUO Zhaokui, LIU Yongzhong, et al. Determination and analysis of complete genomic sequence of three TMV isolates from tobacco producing areas in Heilongjiang [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, 25(1)

*Corresponding author. Email: xdongli@sdau.edu.cn