

## 番茄斑萎病毒属病毒 S RNA 序列比对

徐小刚<sup>a</sup>, 刘雅婷<sup>a\*</sup>, 李永忠<sup>b</sup>, 何婷婷<sup>a</sup>, 韩毅<sup>a</sup>, 孙文涛<sup>a</sup>

(云南农业大学 a.农学与生物技术学院; b.烟草学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 从生物信息数据库 NCBI 中搜索并下载最新有关番茄斑萎病毒属 *Tospovirus* 各种间 S RNA 片段全长序列以及该片段上 NSs、N 的核酸和蛋白质序列着手, 运用 DNASTAR 和 DNAMAN 以及 NPSA 等生物信息软件对其进行比对分析, 结果发现, 以 NSs 蛋白序列建立的系统进化树显示 CCSV 和 TZSV 之间的同源性为 85.8%, IYSV 和 TYRV 之间的同源性达 90%, MYSV 和 PSMV 间的同源性为 97.5%; 通过 N 蛋白序列分析显示, *Tospovirus* 属中有 7 组同源性较高的种; 在 *Tospovirus* 属病毒中非极性氨基酸含量最高, 极性酸性氨基酸最少, 比较 TSWV 中抗性破坏 RB 株系与普通株系在 NSs、N 核酸、蛋白质序列、氨基酸含量和蛋白质二级结构之间的差异, 发现差异不显著。

**关键词:** 番茄斑萎病毒属; 核壳体序列; S RNA 上的非结构蛋白序列; 抗性破坏

中图分类号: S432.4<sup>+</sup>1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0142-05

## The alignment of S RNA sequences in *Tospovirus*

XU Xiao-gang<sup>a</sup>, LIU Ya-ting<sup>a\*</sup>, LI Yong-zhong<sup>b</sup>, HE Ting-ting<sup>a</sup>, HAN Yi<sup>a</sup>, SUN Wen-tao<sup>a</sup>

(a.College of Agronomy and Biotechnology; b. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The nucleic acid and protein sequences on NSs, N and S RNA full-length sequences of *Tospovirus* genus were downloaded from NCBI database, and they were aligned by bio-informatics software DNASTAR, DNAMAN and NPSA. It was demonstrated that homology between CCSV and TZSV was 85.8% on homologous phylogenetic tree on NSs protein sequences, homology between IYSV and TYRV reached 90%, homology between MYSV and PSMV was up to 97.5%. There are 7 groups of high homology with analysing the N protein sequences. *Tospovirus* is rich in non-polar amino acids but polar-acid amino acid is the lowest. At the same time, by alignment TSWV strains between resistance-breaking strain and wild strains on NSs, N nucleic acid and protein sequences, amino acids and the protein secondary structure with no significant differences found.

**Key words:** *Tospovirus*; nucleocapsid protein sequences; non-structural protein in the S RNA full-length sequence; resistance-breaking

番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)是布尼亚病毒科(Bunyaviridae)中唯一能侵染植物的病毒属。该类病毒侵染温带、亚热带和热带82科1 000多种植物, 危害大多数农业和园艺观赏作物, 包括烟草、蔬菜和花卉等, 导致世界范围内重大农业经济损失<sup>[1]</sup>。该属已报道了20个*Tospovirus*病毒种, 包括16个确定种和4个暂定种<sup>[2]</sup>。

*Tospovirus*属病毒基因组由3条单链RNA组成, 分别为S RNA、M RNA和L RNA<sup>[3-5]</sup>。最新报道<sup>[6]</sup>表明, *Tospovirus*属病毒的检测和血清组的分类鉴定以及TSWV中抗性破坏(resistance-breaking, RB)都与S RNA片段有很大的关系, 特别是S RNA片段上的核壳体蛋白N和非结构蛋白NSs。笔者从*Tospovirus*属种间的S RNA全序列以及该序列上

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 国家“973”计划项目(2006CB100204); 云南省自然科学基金项目(2005C0036M, 2007C0036M); 云南省教育厅项目(5Y0171B)

作者简介: 徐小刚(1984—), 男, 浙江衢州人, 硕士研究生; \*通讯作者, liuyating999@yahoo.com.cn

NSs、N 的核酸和蛋白质序列着手, 运用 DNASTAR 和 DNAMAN 以及 NPSA 等生物信息学软件来寻找 *Tospovirus* 属不同种之间的差异, 同时分析 *Tospovirus* 属 TSWV 中 RB 与普通株系之间 NSs、N 核酸和蛋白质序列, 以期为 RB 株系产生机理的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

从美国国家生物技术信息中心(NCBI)搜索所有最新有关 *Tospovirus* 属种间的 NSs、N 和 S RNA 全长片段的核酸和蛋白质序列, 所选序列登录号如表 1 所示。

表 1 *Tospovirus* 属病毒的核酸和蛋白质序列登录号

Table 1 The accession numbers of nucleic acid and protein sequences of *Tospovirus* in the study

序号	<i>Tospovirus</i> 属病毒种类	序列登录号		
		N	NSs	S RNA 全序列
1	CaCV( <i>Capsicum chlorosis virus</i> )	EF602029	EF602030	DQ256123
2	CCSV*( <i>Calla lily chlorotic spot virus</i> )	AY867502	AY867502	AY867502
3	CSNV( <i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> )	AF067068	—	—
4	GBNV( <i>Groundnut bud necrosis virus</i> )	AY871098	NC_003619	NC_003619
5	GRSV( <i>Groundnut ring spot virus</i> )	AF251271	—	—
6	GYSV( <i>Goundnut yellow spot virus</i> )	—	—	—
7	INSV( <i>Impatiens necrotic spot virus</i> )	AB109100	DQ425096	AB109100
8	IYSV( <i>Iris yellow spot virus</i> )	AB378751	AF001387	AF001387
9	MYSV( <i>Melon yellow spot virus</i> )	AB453911	AB453909	NC_008300
10	PCFV( <i>Peanut chlorotic fan virus</i> )	AF080526	AF080526	—
11	PYSV( <i>Peanut yellow spot virus</i> )	AY529714	AF013994	—
12	PSMV( <i>Physalis severe mottle virus</i> )	AF067151	AF067151	—
13	TCSV( <i>Tomato chlorotic spot virus</i> )	AM887766	—	—
14	TSWV( <i>Tomato spotted wilt tospovirus</i> )	AB277581	AB088385	NC_002051
15	TYFRV*( <i>Tomato yellow fruit ring virus</i> )	AJ493270	—	—
16	TYRV*( <i>Tomato yellow fruit ring virus</i> )	DQ810195	DQ810196	—
17	TZSV*( <i>Tomato zonate spot virus</i> )	EF552433	EF552433	NC_010489
18	WBNV( <i>Watermelon bud necrosis virus</i> )	DQ375810	—	—
19	WSMoV( <i>Watermelon silver mottle virus</i> )	AM113762	NC_003843	NC_003843
20	ZLCV( <i>Zucchini lethal chlorosis tospovirus</i> )	AF067069	—	—

“—”示数据库中未发布, “\*”示该种为 *Tospovirus* 属的暂定种; 其余为确定种。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *Tospovirus* 属种间 S RNA 片段上 NSs、N 序列同源性及进化树的建立

从 NCBI 数据库中下载有关 *Tospovirus* 属种间 S RNA 片段上 NSs、N 的核酸和蛋白质序列, 用 DNASTAR 软件中的 Editseq 把 FASTA 格式转化为 SEQ 格式文件, 再用 DNAMAN 软件进行同源性分析, 并建立系统进化树。

### 1.2.2 *Tospovirus* 属种间 S RNA 全长片段以及该片段上 NSs、N 核酸序列分析比对

运用 DNAMAN 软件对 *Tospovirus* 属种间 S RNA 全长片段以及该片段上 NSs、N 核酸序列进行多重比对(由于遗传密码子具有简并性和引物设计

的需要, 选择核酸序列进行比对), 再用 DNASTAR 和 Clustal 软件进一步验证。

### 1.2.3 *Tospovirus* 属种间 S RNA 片段上 NSs、N 蛋白质一级结构中氨基酸含量的预测分析

在线软件 NPSA([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_compo.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_compo.html)) 预测 *Tospovirus* 属种间 S RNA 全长片段上的 NSs、N 氨基酸组成成分并作差异分析。

### 1.2.4 TSWV 中 RB 株系与普通株系在 NSs、N 核酸和蛋白质序列上的差异比对以及蛋白质一、二级结构上的差异比较

从 NCBI 信息数据库中下载有关 *Tospovirus* 属中 TSWV 种的 NSs、N 核酸和蛋白质序列, 并标记

来源地、分离物、寄主以及是否为 RB 株系图表(略)；使用 DNAMAN 软件对其进行核酸和蛋白质序列的多重比对，寻找差异序列位点；运用在线软件 SMART([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?GENOMIC=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1))预测蛋白质一级结构氨基酸组成成分差异；使用在线软件 NPSA 预测蛋白质二级结构差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Tospovirus* 属种间 S RNA 片段上 NSs、N 序列同源性

把从数据库中下载并已处理的 *Tospovirus* 属种间的 NSs 蛋白序列用 DNAMAN 生物软件建立系统进化树。从 *Tospovirus* 属病毒种间 S RNA 片段上 NSs 蛋白序列建立的系统进化树发现，CaCV、GBNV、WSMoV 之间的同源性在 78.5% 以上，CCSV 和 TZSV 之间的同源性在 85.8% 以上，相似程度较高；IYSV 与 TYRV 之间的同源性高达 90%，具有很高的相似性；MYSV 与 PSMV 之间的同源性为 97.3%，序列非常相似(图 1)。

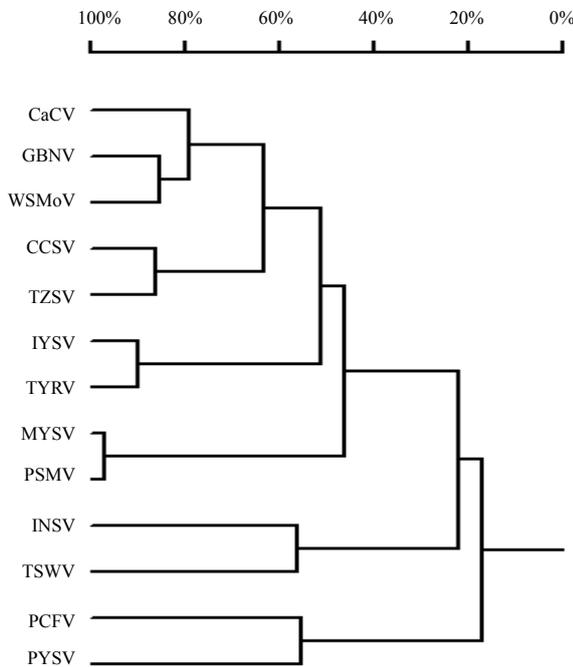


图 1 *Tospovirus* 属种间 NSs 蛋白的系统进化树  
Fig.1 The phylogenetic tree of NSs protein sequences in *Tospovirus*

同样地，把从数据库中下载并已处理 *Tospovirus* 属种间的 N 蛋白质序列用 DNAMAN 生物软件建立

系统进化树，从中可以发现 7 组同源性较高，CaCV、GBNV、WSMoV 和 WBNV 为 A 组，同源性为 81.6%~85.5%；CCSV 和 TZSV 为 B 组，同源性为 81.3%；IYSV、TYFRV 和 TYRV 为 C 组，同源性在 73.2% 以上，其中 TYFRV 和 TYRV 之间的同源性高达 99.3%；CSNV 和 ZLCV 为 D 组，同源性为 80.1%；GRSV 和 TCSV 为 E 组，其同源性为 88.2%；PCFV 和 PYSV 为 F 组，同源性在 67.2% 以上(图 2)。目前血清组分类已明确的种已在图 2 中标出其所属的血清组类型。

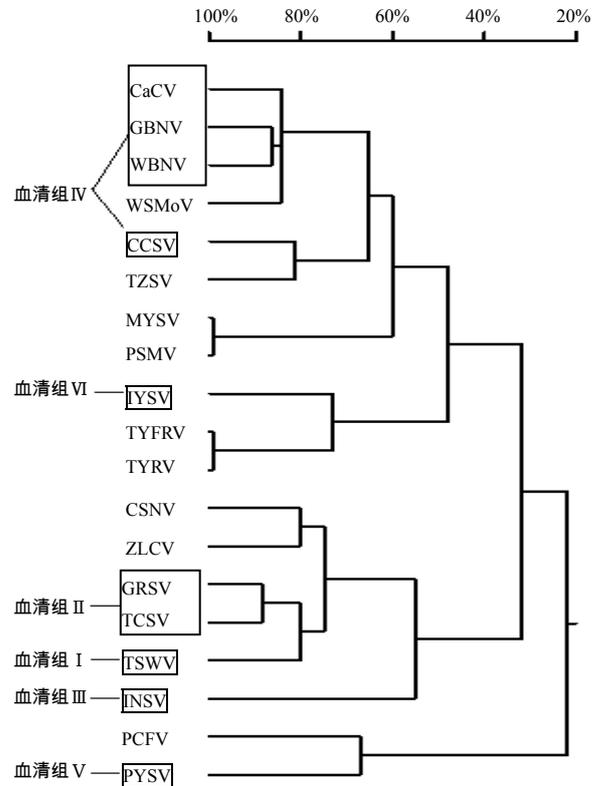


图 2 *Tospovirus* 属各种间 N 蛋白的系统进化树  
Fig.2 The phylogenetic tree of N protein sequences in *Tospovirus*

### 2.2 *Tospovirus* 属种间 S RNA 全长片段以及该片段上 NSs、N 核酸序列差异

用生物软件 DNAMAN 对 *Tospovirus* 属各病毒种中 S RNA 链上 NSs 核酸序列进行多重序列比对，发现病毒种之间有 6 个较明显的保守区域，其对应的起始位点分别是 10, 91, 146, 587, 687 和 1 074；同时，对 N 核酸序列比对发现病毒种的 5'端存在一段特别保守的区域：5'-ATGTCTA-3'。S RNA 全长核酸序列进行比对时发现在 5'端有一段非常保守

的共同区域: 5'-AGAGCAAT-3', 同时在它们的 3' 端也发现一段特别保守区域: 5'-ATTG CTC-3', 两端可以互补. 使用 DNAstar 和 Clustal 两种不同的软件验证结果可靠.

### 2.3 *Tospovirus* 属种间 NSs、N 氨基酸组成成分差异

#### 2.3.1 编码 NSs 氨基酸组成成分比较

比较 *Tospovirus* 属 13 个病毒种的 NSs 序列氨基酸含量, 发现在所有 *Tospovirus* 属病毒中, 非极性氨基酸和极性中性氨基酸的含量明显高于极性酸性氨基酸和极性碱性氨基酸; 在非极性、极性酸性、极性中性和极性碱性氨基酸上, CCSV 氨基酸含量与 TZSV 都很相近; 在极性中性和极性碱性氨基酸上 WSMoV 的氨基酸含量与 CCSV 相一致; 在极性碱性氨基酸上, PYSV 与 PCFV 的含量相同, 都为 13.13%.

#### 2.3.2 编码核壳体 N 的氨基酸组成成分比较

比较 *Tospovirus* 属 19 个病毒种的 N 序列氨基酸含量, 同样可以发现在所有 *Tospovirus* 属病毒中, 非极性氨基酸、极性中性氨基酸、极性碱性氨基酸、极性酸性氨基酸含量依次降低; TZSV 与 GBNV 在非极性、极性中性、极性酸性和极性碱性氨基酸含量都比较接近, 同时极性酸性、极性碱性氨基酸含量与 CCSV 非常相似; WSMoV 非极性、极性碱性氨基酸含量与 GBNV 相一致; PCFV 极性碱性氨基酸含量与 PYSV 接近. TYFRV、TYRV 氨基酸含量几乎相同, 与此同时非极性和极性氨基酸含量与 TYSV 保持一致.

### 2.4 TSWV 中非结构蛋白 NSs 和核壳体蛋白 N 核酸、蛋白质序列差异比对以及氨基酸含量和蛋白质二级结构差异比较

通过 DNAMAN 生物软件、在线预测软件 NPSA 和 SMART, 对 TSWV 中非结构蛋白 NSs 和核壳体蛋白 N 的核酸和蛋白质序列的多重序列比对和蛋白质一级、二级结构预测, 发现 RB 株系和普通株系之间的序列相似程度很高, 有差异, 但没有发现明显突变一致的序列, 也没有发现氨基酸结构域、重复修饰以及特征有差异.

## 3 讨论

血清组是一种广泛用于对 *Tospovirus* 属病毒新

种鉴定和分类的重要指标<sup>[7-8]</sup>, 因目前 *Tospovirus* 属病毒中 N 含量最丰富和测序公布最多最全, 笔者以 N 氨基酸建立的同源进化树为主要依据, 以 NSs 蛋白建立的系统进化树以及对其氨基酸含量预测分析为辅助依据, 对 *Tospovirus* 属病毒最新的 20 个种进行同源性分析, 并对 *Tospovirus* 属病毒血清组分类增补. 目前 *Tospovirus* 属病毒血清组划分为 6 个<sup>[9-12]</sup>: 血清组 I (代表种为 TSWV), 血清组 II (代表种为 TCSV、GRSV), 血清组 III (代表种为 INSV), 血清组 IV (代表种为 GBNV、CCSV、WBNV、CaCV), 血清组 V (代表种为 PYSV), 血清组 VI (代表种为 IYSV). 运用 DNAMAN 软件对 *Tospovirus* 属种间 NSs、N 蛋白质的核酸序列建立系统进化树, 结果显示以上分类已明确的 11 个种均符合其对应的血清组, 说明所建立的系统进化树具有科学性和可靠性.

本研究中发现, WSMoV 在 N 蛋白质序列建立的系统进化树上显示它与血清组 IV 中 GBNV、WBNV、CaCV、PBNV 的同源性在 81.6%~85.5%, 相似程度很高. 在 NSs 蛋白质序列建立的系统进化树上也显示 WSMoV 与血清组 IV 中的 GBNV 和 PBNV 同源性高达 84.8%; 在编码 NSs 的氨基酸百分含量预测分析中, WSMoV 的极性中性和极性碱性氨基酸百分含量与 CCSV 相一致; 而在编码 N 的氨基酸百分含量预测分析中, WSMoV 非极性、极性碱性氨基酸含量与 GBNV 相一致. 由此推断 WSMoV 属于 *Tospovirus* 属病毒血清组 IV. 同理, 推断 TZSV 属于 *Tospovirus* 属病毒血清组 IV, PCFV 属于 *Tospovirus* 属病毒血清组 V, 两个暂定种 TYRV 与 TYFRV 可能属于 *Tospovirus* 属病毒血清组 VI. 同时发现, TYRV 与 TYFRV 在 N 蛋白质序列建立的系统进化树上同源性为 99.3%, 几乎一致; TYFRV、TYRV 4 种氨基酸含量几乎相同, TYRV 与 TYFRV 可能为同一个种.

从 *Tospovirus* 属种间 S RNA 全长片段以及该片段上 NSs、N 核酸序列比对结果, 发现 *Tospovirus* 属种间 NSs 氨基酸有 6 个较明显的保守区域. 还发现 N 核酸的 2 个较明显保守区域. 在 S RNA 全长序列核酸序列的比对中, 发现 *Tospovirus* 属病毒 S RNA 全长序列两端存在特别的保守区域. 这些保守

区域的发现可为 *Tospovirus* 属病毒的检测与鉴定(特别是引物设计)提供参考。

对在 NSs、N 和 S RNA 全长序列上 TSWV 的 RB 株系序列与普通株系序列的比对时发现有所差异,没有发现 RB 株系有明显的突变一致的核苷酸或蛋白质,氨基酸含量和蛋白质拓扑结构上也没有发现明显的差异,由此推断没有找到很明显的序列差异的原因:一是在数据库中一些 RB 株系被当成普通株系测出并公布出来,给序列比对得到的结果造成了一定的干扰。二是 RB 株系可能并不是由 SRNA 片段上碱基发生改变造成的,而是在除 S RNA 片段之外的另两个片段 M RNA 和 L RNA 上核酸和蛋白质序列突变或造成。三是可能由环境造成的非遗传性进化机制再由传播介体进行传毒进行从而导致抗性破坏。

#### 参考文献:

- [1] Whitfield A E, Ullman D E, German T L. *Tospovirus*-thrips interactions[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 459-489.
- [2] Leslie Rickert Campbell, Karen L Robb, Diane E Ullman. The Complete *Tospovirus* Resource[EB/OL]. <http://www.oznet.ksu.edu/tospovirus/2009-08-15>.
- [3] De Haan P, Kormelink R, Resenda R, et al. Tomato spittle wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase [J]. *J Gen Virol*, 1991, 71: 2207-2216.
- [4] Kormelink R, De hann P, Meurs C, et al. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73: 2795-2804.
- [5] De Haan P, Wagemarkers L, Peter D, et al. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1001-1007.
- [6] Margaria P, Ciuffo M, Pacifico D, et al. Evidence that the nonstructural protein of tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interacyion with resistant pepper carrying the Tsw gene[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(5): 547-558.
- [7] Chu F H, Chao C H, Chung M H, et al. Completion of the genome sequence of watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting *tospoviruses* in five serogroups[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(4): 361-368.
- [8] Chu F H, Chao C H, Peng Y C, et al. Serological and molecular characterization of peanut chlorotic fan-spot virus, a new species of the genus *tospovirus*[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(9): 856-863.
- [9] Maiss E I L, Breyel E, Adam G. Clong and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 461-464.
- [10] De Avila A C, de Hann P, kormelink R, et al. Classification of *tospoviruses* based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74: 153-159.
- [11] Pang S Z, Slightom J L, Gonsalves D. The biological properties of a distint *tospovirus* and sequence analysis of its S RNA[J]. *Pjytopathology*, 1993, 83: 728-733.
- [12] Law M D, Moyer J W. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distint N protein[J]. *J General Virology*, 1990, 71: 933-938.

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:胡东平