

贵州烟田马铃薯 Y 病毒优势株系全序列克隆及系统进化分析

夏范讲¹ 郭玉双² 贾蒙骜^{2*}

(1. 中国烟草总公司 贵州省公司, 贵阳 550004;

2. 贵州省烟草科学研究院 烟草行业重点实验室, 贵阳 550081)

摘要 为了解马铃薯 Y 病毒在贵州烟田的发生和流行规律,对 2013—2015 年采集到的贵州省多个烟区呈现典型茎脉坏死症状的疑似受马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)侵染的烟草样品进行单斑分离和病毒鉴定,并以现有 PVY 序列信息为参考,设计了 4 对 PVY 特异引物,经过 RT-PCR 扩增、T 载体连接、序列测定以及序列拼接,并利用 MEGA 软件进行系统进化分析。结果发现 PVY 福泉分离物(PVY Fuquan isolate, PVY-FQ)和 PVY 大方分离物(PVY Dafang isolate, PVY-DF)为优势株系并获得了 PVY-FQ 和 PVY-DF 的全基因组序列。PVY FQ 整条基因组由 9 699 个碱基组成,编码多聚蛋白的开放阅读框位于第 188~9 373 nt;PVY DF 整条基因组由 9 706 个碱基组成,编码多聚蛋白的开放阅读框位于第 190~9 375 nt。2 条序列的基本特征与已报道 PVY 基因组一致。对 PVY-FQ 和 PVY-DF 全序列与已报道 PVY 序列进行系统进化分析发现,PVY-FQ 与 PVY^{NTN} 株系具有较高的亲缘关系,而 PVY-DF 与 PVY^N 具有较高亲缘关系。

关键词 马铃薯 Y 病毒;基因组序列;系统进化分析

中图分类号 S43 文章编号 1007-4333(2017)07-0034-06 文献标志码 A

Full sequence cloning and phylogenetic analysis of *Potato virus Y* predominant strains collected from tobacco field in Guizhou Province

XIA Fanjiang¹, GUO Yushuang², JIA Mengao^{2*}

(1. Guizhou Tobacco Monopoly Administration, Guiyang 550004, China;

2. Key Laboratory of Molecular Genetics, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China)

Abstract Studies on virus genome variation are necessary for virus disease prediction and control. During 2013 – 2015, tobacco samples which showed typical vein necrosis symptom were collected from Guizhou Province. Four pairs of specific primers were designed from the conserved regions of published genome sequences of *Potato virus Y* (PVY). After total RNA extraction, RT-PCR, molecular cloning and sequencing, the data of PVY genome sequence was then used for phylogenetic analysis by MEGA software. The result suggested that two PVY strains, PVY-FQ and PVY-DF, which were collected in tobacco plants from Fuquan area and Dafang area respectively, were confirmed as dominant isolates. Genome sequence analysis showed that PVY-FQ and PVY-DF contained 9 699 and 9 706 nt, of which their unique ORF located in 188 – 9 373 and 190 – 9 375 nt respectively. PVY-FQ and PVY-DF were confirmed sharing common genome structure with other isolates published previously. Phylogenetic analysis suggested that PV-FQ had high homology with PVY^{NTN} strain, while PVY-DF had high homology with PVY^N strain.

Keywords *Potato virus Y*; genome sequence; phylogenetic analysis

马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)是马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)的典型代表,病毒粒子为线状,略弯曲,无包膜^[1-2]。PVY 基因组为正单链 RNA,全长约 9.7 kb,可以通

收稿日期:2016-04-28

基金项目:贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2013]2194 号);中国烟草总公司贵州省公司科技计划项目(201504)

第一作者:夏范讲,助理研究员,主要从事烟草植保研究,E-mail:fanjiangnuli@163.com

通讯作者:贾蒙骜,副研究员,主要从事植物病毒学研究,E-mail:jiamengao@cau.edu.cn

过机械摩擦传播,田间大发生主要是通过蚜虫作为传毒介体进行传播^[3]。在以往的生产中,人们常通过鉴别寄主接种后的症状差异将 PVY 区分为 3 个株系,分别为引起烟草系统性花叶的 PVY^o 株系(普通株系, ordinary strain)、引起烟草叶脉坏死的 PVY^N(坏死型株系)、引起带有 Nc 抗性基因马铃薯顶端坏死的 PVY^C 株系(点刻条斑株系)^[3]。然而,随着免疫学检测技术和分子生物学检测技术的发展,人们发现,单纯的症状识别根本无法区分发生重组的病毒株系,并且重组株系在 PVY 的发生流行过程中所占比例越来越大^[4]。在地理条件以山地为主的贵州,烟草和马铃薯是主要的农作物,且 2 种农作物常相邻而种,为 PVY 发生和广泛传播提供了条件。而贵州全省生态区域多样、不同区域气候条件差异明显,这些因素也使得 PVY 可能发生频繁的变异和重组。2013—2015 年通过广泛采集在各主要烟区的疑似 PVY 症状样品,并对采集到的样品进行检测和序列测定,发现虽然序列变异和重组明显,但是优势株系数量在采集的样品中依然占据多数。尽快确定优势株系的全基因组序列,可以更全面地了解 PVY 在贵州的流行发生规律,是有效制定防控措施的重要前提。本研究通过对优势株系全基因组序列的克隆,以期构建相应的侵染性克隆奠定物质基础,为长期监测贵州 PVY 优势株系的变化提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

洋酸浆(*Physalis floridana*) (由黑龙江农科院马铃薯脱毒研究所提供); 本生烟(*Nicotiana benthamina*) 和苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*) 由中国农业大

学范在丰老师实验室提供; PVY 毒源由本实验室采集自黔南州福泉市烟田。

1.2 生化试剂

反转录试剂盒 (Promega reverse transcript system No. M7741) 和 DNA 聚合酶 (Promega pfu taq No. A5001) 购自 Promega 公司 DNA marker (Tans2K, 货号: BM101; Tans2K plus, 货号: BM111; 全式金); pBL 平端连接 T 载体 (货号: VT206 购自天根生化科技(北京)有限公司)

1.3 方法

1.3.1 毒源采集和分离

采集: 在烟田选择呈现典型茎脉坏死症状的 PVY 疑似侵染植株, 每个植株采集叶片 5~10 g, 使用锡箔纸包好后, 标记采集时间和采集地点, 然后立即保存于液氮中。

单斑分离: 取毒源样品 0.1 g, 液氮研磨, 然后以 1 mL 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液重悬, 摩擦接种枯斑寄主洋酸浆, 20 d 后分离单斑, 然后以单斑在此接种, 经过 3 次单斑分离后, 通过接种本生烟保存毒源。

1.3.2 引物设计

收集已报道的 PVY 全长序列信息, 利用 DNAMAN (Lynnon Biosoft, Canada) 软件进行全序列比对, 选择最为保守的区域设计引物。引物由上海捷瑞生物技术公司合成, 引物序列及所在参考序列中的位置见表 1。

1.3.3 总 RNA 的提取

采用 Trizol 试剂进行 RNA 提取, 提取的 RNA 用 20 μ L RNAase-free 水溶解, 测定 RNA 浓度, 终浓度为 1 μ g/ μ L。提取的总 RNA 立即用于反转录反应。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

名称 Name of primer	序列 Sequence (5'-3')	扩增片段在 PVY 基因组上的位置 Location of the amplification fragment in PVY genome
5'UTR f	AAATTTAAACAACCTCAATACAAC	5'UTR~2.1 kb
2.1 r	ATCATAGTTGGCCAGGTTCC	
1.9 f	TTAGGCAGAAGATGAAAGGTG	1.9~4.97 kb
4.97 r	GAATGTCATGTATGACTGGATGC	
4.5 f	ACACTGAGAAGGGAATTATTG	4.5~7.76 kb
7.76 r	TCCTCGTCTTATTTGCAAGTATC	
7.3 f	GAGCAAGAAATTTTCAAAGC	7.3 kb~3'UTR
3'UTR r	GTCTCCTGATTGAAGTTTACAG	

1.3.4 RT-PCR

取 1 μL RNA、分别加入 1 μL oligodT、Random primer 和 2 μL RNAase-free 水,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下变性 5 min,取出冰上孵育 5 min;分别依次加入 5 μL 5 \times buffer,1 μL dNTP mixture(10 nmol/L),1 μL RNase inhibitor(40 U/ μL),1 μL M-MLV 反转录酶,最后用 RNAase-free 水调整体积为 20 μL 。整个反应体系在 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

取 1 μL 反转录产物为模板,再依次加入 2.5 μL 10 \times PCR buffer,正向和反向引物各 1 μL 、0.5 μL dNTP mixture(10 nmol/L)、0.3 μL pfu *Taq*,最后用 ddH₂O 定容至 25 μL 。然后按照 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$,30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$,5 min。

1.3.5 PVY 疑似样品的检测

提取样品总 RNA,反转录,以 5'UTR~2.1 kb 引物进行 PCR 扩增,然后通过电泳和测序的方式确定所检测样品是否感染 PVY。

1.3.6 序列测定和分析

将 PCR 产物切胶回收,测定浓度后使用冷冻抽

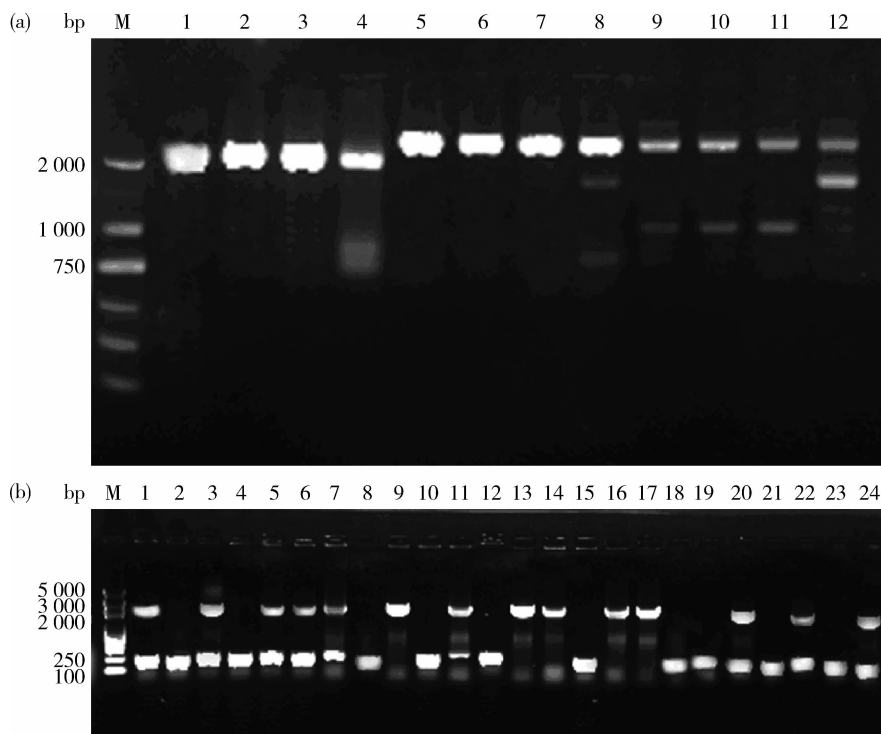
干装置进行浓缩。获得的 PCR 产物连接 T 载体上。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,并进行阳性克隆筛选,每个片段的连接转化产物至少送 5 个阳性转化子用于测序。

测序结果采用 DNAMAN 软件进行拼接。使用 Clustal^[3]软件与已知 PVY 全长序列进行比对,最后采用 MEGA4 软件,以邻位法(Neighbor-joining,NJ)进行系统进化分析,设置自举法检验(Bootstrap trials)不低于 500 次。

2 结果与分析

2.1 PVY 样品的鉴定

提取采集到的 36 份烟草样品 RNA,RT-PCR 扩增对采集的样品进行鉴定,其中 26 份被确定为 PVY 阳性(图 1(a),图 1(b),对扩增获得的序列进行分析发现有 7 份样品 5'UTR~2.1 kb 的基因序列基本完全一致,另外 9 份样品基因序列同源性达到 98%。因此,可以认为这 2 组样品所代表的 PVY 分离物在烟田是优势株系。



(a)M 为 Tans2K marker;1~7,为扩增产物;(b)M 为 Tans2K plus marker,1~24 为扩增产物。预期扩增片段约为 2 300 bp。

(a) M, Tans2K DNA marker; Lane 1-7, production of RT-PCR amplification; (b) M, Tans2K plus DNA marker, Lane 1-24, production of RT-PCR amplification. The expected amplification segment in each lane is about 2 300 bp.

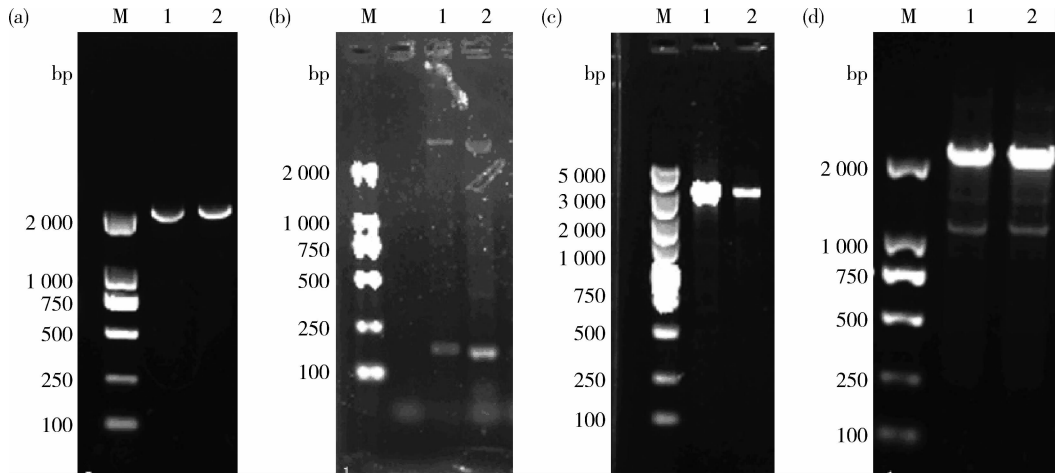
图 1 采集的烟草样品中 PVY 的 RT-PCR 检测

Fig. 1 Detection of PVY in collected samples by RT-PCR

2.2 PVY 全基因组分节段扩增结果

在 2 个优势株系样品中,选择 PVY 福泉分离物(PVY Fuquan isolate, PVY-FQ)和 PVY 大方分离物(PVY Dafang isolate, PVY-DF)作为毒源保存和全基因组扩增的材料。分别提取总 RNA,然后使

用 Oligod T 和 Random primer 进行反转录,以反转录产物为模板,以表 1 所述的 4 对引物进行 PCR 的扩增。结果显示,2 个分离物的 cDNA 模板均可以通过 PCR 扩增,获得 4 对引物预期大小的扩增产物(图 2(a),(b),(c)和(d))。



(a)5'UTR~2.1 kb 片段扩增结果;(b)1.9~4.9 kb 片段扩增结果;(c)4.5~7.76 kb 片段扩增结果;(d)7.3 kb~3'UTR 片段扩增结果;(a)、(b)、(d)中 M 为 Maker Trans 2K;(c)M 为 Trans 2K Plus。

(a) Amplification segments which matched to 5'UTR-2.1 K of PVY genome;(b) Amplification segments which matched to 1.9-4.9 kb of PVY genome;(c) Amplification segments which matched to 4.5-7.76 kb of PVY genome;(d) Amplification segments which matched to 7.3 kb-3'UTR of PVY. In(a),(b) and(d):M, Tans2K DNA marker;1,PVY-FQ; 2,PVY-DF. In (c):M, Tans2K plus DNA marker;1,PVY-FQ; 2,PVY-DF.

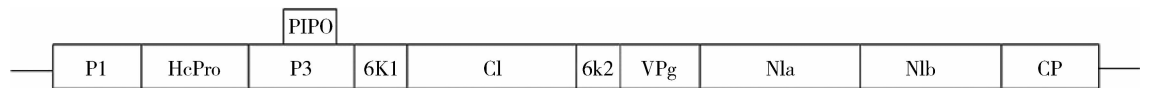
图 2 PVY-FQ 和 PVY-DF 基因组分节段扩增结果

Fig. 2 Amplification of PVY-FQ and PVY-DF genome segments by RT-PCR

2.3 序列的拼接和进化分析

PVY FQ 和 PVY DF 各节段 PCR 产物回收后,连接载体测序。测序结果进行拼接,结果表明,PVY FQ (NCBI 登录号: KU724101)全基因组共 9 699 个碱基,编码多聚蛋白的阅读框起始于

188 nt,终止于 9 373 nt;PVY DF (NCBI 登录号: KX009783)全基因组共 9 706 个碱基,编码多聚蛋白的阅读框起始于 190 nt,终止于 9 375 nt。2 个分离物多聚蛋白的编码结构与 PVY 已报道的特征一致(图 3)。



PI:188~1 012 nt/190~1 014 nt;Hc-Pro:1 013~2 407 nt/1 015~2 409 nt;P3:2 408~3 502 nt/2 410~3 504 nt;PIPO: 2 917~3 147 nt/2 919~3 149 nt;6K1:3 503~3 658 nt/3 505~3 660 nt;CI:3 659~5 560 nt/3 661~5 562 nt;6K2:5 561~5 716 nt/5 563~5 718 nt;VPg:5 717~6 280 nt/5 719~6 282 nt;NIa:6 281~7 012 nt/6 283~7 014 nt;NIb:7 013~8 569 nt/7 015~8 571 nt;CP:8 570~9 373 nt/8 572~9 375 nt

图 3 PVY-FQ/PVY-DF 基因组结构示意图

Fig. 3 Genome organization of PVY-DF and PVY-FQ

由于重组和变异频发,不同 PVY 分离物之间遗传差异较大。通过将拼接好的 PVY-FQ 和 PVY-DF 序列与几个 PVY 代表性株系的基因组数据进行同源比对和遗传距离分析,这 2 个同样采集与贵州的优势分离物还是存在较明显的差异(表 2 和表 3)。

为了进一步确定这 2 个分离物的亲缘关系,将 PVY-FQ 和 PVY-DF 序列与部分已公布的 PVY 全基因序列进行系统进化分析。结果显示,其中 PVY-FQ 与已报道的 PVY^{NTN}株系更近,而 PVY-DF 则与典型的 PVY^N株系关系更近(图 4)。另外,

进化分析的结果还显示,虽然在烟田,N株系和O株系症状差异明显,而NTN株系和N株系表现的症状非常相似,但是重组株系NTN和典型的N株系在进化上的差异更为明显。

表2 PVY-FQ与PVY主要株系同源性和遗传距离分析

Table 2 The homology and genetic distance among PVY-FQ and main PVY strain published previously

病毒株系 Strain	病毒株系 Strain				
	PVY-FQ	PVY ^N	PVY ^O	PVY ^{N:O}	PVY ^{NTN}
PVY-FQ		0.08	0.14	0.08	0.03
PVY ^N	87%				
PVY ^O	83%	91%			
PVY ^{N:O}	88%	92%	95%		
PVY ^{NTN}	92%	95%	88%	90%	

表3 PVY-DF与PVY主要株系同源性和遗传距离分析

Table 3 The homology and genetic distance among PVY-DF and main PVY strain published previously

病毒株系 Strain	病毒株系 Strain				
	PVY-DF	PVY ^N	PVY ^O	PVY ^{N:O}	PVY ^{NTN}
PVY-DF		0.02	0.08	0.04	0.11
PVY ^N	96%				
PVY ^O	88%	91%			
PVY ^{N:O}	93%	92%	95%		
PVY ^{NTN}	86%	95%	88%	90%	

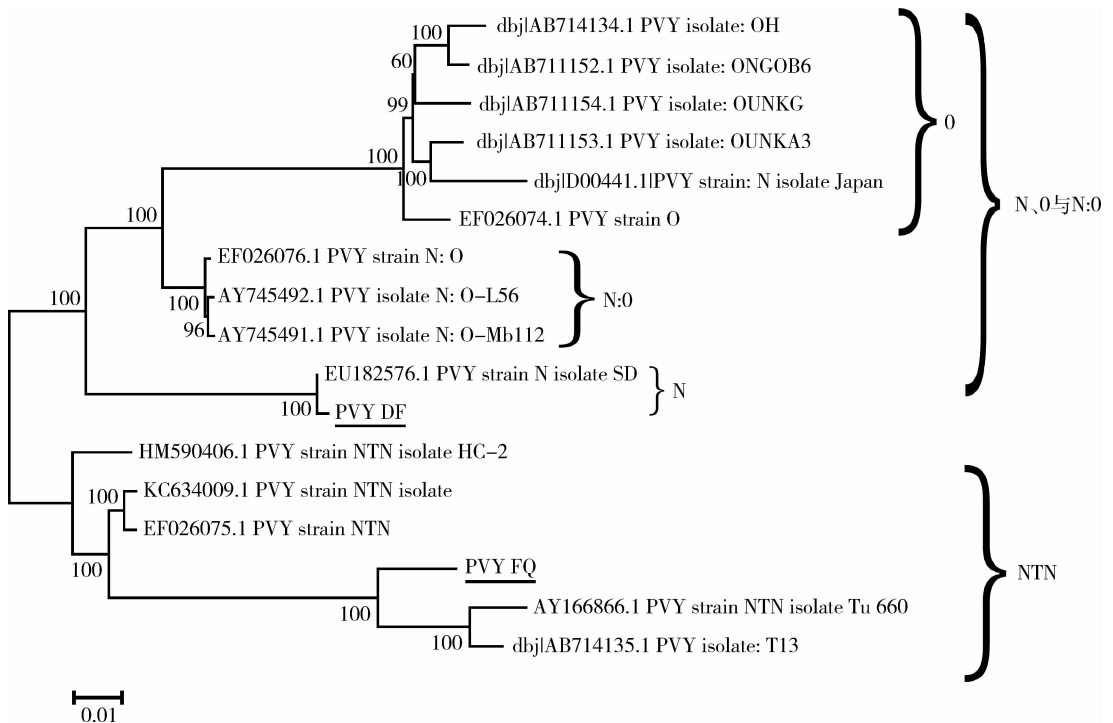


图4 PVY FQ和PVY DF全基因组序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic trees of PVY FQ and PVY DF complete sequences

3 讨论

本研究通过大量采集贵州烟田的疑似 PVY 样品,筛选优势分离物,并对优势分离物的全基因组序列进行克隆和测序。研究结果表明以 PVY-FQ 和 PVY-DF 为代表的优势分离物序列全长为 9 699 nt 和 9 706 nt,系统进化分析显示,PVY-FQ 与 PVY^{NTN}株系具有密切的亲缘关系,而 PVY-DF 与 PVY^N亲缘关系较近。

以往对 PVY 等 *Potyvirus* 的变异和重组研究中,编码 CP 蛋白和 P1-HC 的基因序列经常作为研究目标^[5-8]。然而,*Potyvirus* 的变异和重组往往是全基因组水平发生的,且在基因组不同位置上变异程度不同。目前研究显示 P1、HC-pro、VPg 和 CP 基因等区段是重组发生热点,因此,仅局限于某个区段会使对变异和重组的研究过于片面。目前,对马铃薯上 PVY 主要株系的研究显示,PVY N:O 发生普遍^[9]。然而在烟草实际生产中,形成茎脉坏死的 PVY 株系对生产造成的威胁最大,由于茎脉坏死症状是 PVY^N的典型症状,因此长期以来 PVY^N是贵州烟草病害的研究人员关注的唯一对象。然而我们的研究结果显示,与 PVY^N一样,PVY^{NTN}的存在同样普遍。这与马铃薯的 PVY 株系研究结果略有差异,贵州独特的山地地形和气候条件以及茄科作物混种的栽培模式使得 PVY 基因组形成重组是大概率事件,因此 PVY^{NTN}这种典型的重组株系普遍存在是符合逻辑的^[10]。同时,这也预示着,会出现更多甚至是新的重组株系。因此,以 PVY 分离物全基因组数据为基础进行 PVY 变异和重组分析是必要的。

程序和算法是生物信息学分析的核心。目前在分子系统发育研究中,常见的建树方法有邻位法(Neighbor-Joining)、最大简约法(Maximum Parsimony)、贝叶斯法(Bayesian inference, BI)和最大似然法(Maximum Likelihood)^[11]。上述方法各有特点,其中以最大似然法和邻位法最为常用。最大似然法普遍被认为是与进化事实吻合最好的建树方法^[12],但是当序列差异略大时计算强度高的缺陷显得十分突出;大多数情况下邻位法在计算强度和建树效果上较为平衡,因此被广泛应用,特别是在病毒分离物的进化研究中。

参考文献 References

[1] Shukla D D, Ward C W, Brunt A A. *The Potyviridae* [M]. Wallingford:

- Centre for Agriculture and Biosciences International, 1994
- [2] King A M, Lefkowitz E, Adams M J, Carstens E B. *Virus Taxonomy* [C]. In: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011
- [3] Smith K M. On the composite nature of certain potato virus disease of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission [J]. *Proceeding of Royal Society of London, Series B*, 1981, 109: 251-226
- [4] Quenouille J, Vassilakos N, Moury B. Potato virus Y: A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(5): 439-452
- [3] Larkin M A, Blackshields G, Brown, N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Clustal W and Clustal X version 2. 0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948
- [5] 王秀芳, 朱常香, 温孚江, 竺晓平, 郭兴启. 一个马铃薯 Y 病毒山东分离物的分离与鉴定 [J]. *植物病理学报*, 2003, 33(3): 203-208
- Wang X F, Zhu C X, Wen F J, Zhu X P, Guo X Q. Isolation and identification of a potato virus Y isolate in Shandong [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(3): 203-208 (in Chinese)
- [6] 吴志明, 时星, 谢晓亮, 温春秀, 张庆良. 河北省马铃薯 Y 病毒株系分子鉴定及其 RT-PCR 检测 [J]. *河北农业大学学报*, 2005, 28(3): 54-59
- Wu Z M, Shi X, Xie X L, Wen C X, Zhang Q L. Molecular identification of Hebei potato virus Y isolate and its detection by RT-PCR [J]. *Journal of Hebei Agricultural University* 2005, 28(3): 54-59 (in Chinese)
- [7] 高芳鑫, 沈建国, 史凤阳, 方治国, 谢联辉, 詹家绥. 中国马铃薯 Y 病毒的检测鉴定及 CP 基因的分子变异 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3125-3133
- Gao F L, Shen J G, Shi F Y, Fang Z G, Xie L H, Zhan J S. Detection and molecular variation of potato virus Y CP gene in China [J]. *Scientia Agriculture Sinica*, 2013, 46(15): 3125-3133 (in Chinese)
- [8] Hu X, Karasev, A V, Brown, C J, Lorenzen, J H. Sequence characteristics of potato virus Y recombinant [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90: 3033-3041
- [9] 陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 中国部分马铃薯产区马铃薯 Y 病毒的株系分化和鉴定 [J]. *河南农业大学学报*, 2011, 45(5): 548-551
- Chen S H, Liu X L, Zhang X T, Wu X Q. Study on the PVY strain differentiation and identification of some potato producing areas in China [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2011, 45(5): 548-551 (in Chinese)
- [10] Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Genomic variability in potato Virus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single or multiple recombinants between PVY^O and PVY^N [J]. *Archive of Virology* 2002, 147(2): 363-378 (in Chinese)
- [11] 吴祖建, 高芳鑫, 沈建国. 生物信息学分析实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 158-159
- Wu Z J, Gao F L, Shen J G. *The Practice of Bioinformatics Analysis* [M]. Beijing: Science Press, 2010: 158-159 (in Chinese)
- [12] 黄原. 分子系统发生学 [M]. 北京: 科学出版社, 2012
- Huang Y. *Molecular Phylogenetics* [M]. Beijing: Science Press, 2012 (in Chinese)

责任编辑: 吕晓梅