

两个马铃薯Y病毒黑龙江马铃薯分离物株系鉴定

程林发¹ 张凤桐¹ 姜瀚林¹ 白艳菊² 耿超^{1*} 李向东^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东省农业微生物重点实验室, 泰安 271018;

2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

摘要: 为明确分离自黑龙江省克山县马铃薯上的2个病毒分离物KS4和KS7的分类地位, 通过RT-PCR扩增、克隆获得其基因组序列, 利用重组分析程序包和最大似然法分别进行重组分析和系统发育分析。结果显示, 分离物KS4和KS7的开放阅读框均有9 186个核苷酸, 编码3 061个氨基酸, 分离物KS4的核苷酸和氨基酸序列均与马铃薯Y病毒(potato virus Y, PVY)分离物Mb112一致率最高, 分别为96.9%和98.4%; 分离物KS7的核苷酸序列与PVY分离物12-94一致率最高, 为97.4%, 其氨基酸序列与PVY分离物SYR-II-Be1一致率最高, 为97.8%。重组分析表明, 分离物KS4和KS7均为分离物N-605和Oz的重组体, 其中KS4基因组5'-端的2 392个核苷酸来自分离物N-605, 其余核苷酸来自分离物Oz; KS7基因组的第800~2 227个核苷酸和第5 637~8 950个核苷酸来自分离物N-605, 其余核苷酸来自分离物Oz。系统发育分析发现, 分离物KS4被聚类到N:O株系(PVY^{N:O}), 分离物KS7被聚类到NTN株系(PVY^{NTN})b型。

关键词: 马铃薯Y病毒; 一致率; 重组; 系统发育分析

Identification of two potato virus Y isolates from potato in Heilongjiang, China

Cheng Linfa¹ Zhang Fengtong¹ Jiang Hanlin¹ Bai Yanju² Geng Chao^{1*} Li Xiangdong^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Plant Protection, Shandong

Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China; 2. Heilongjiang Academy of

Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China)

Abstract: To identify the taxonomic status of potato virus Y (PVY) isolates KS4 and KS7 collected from potato plants in Keshan County of Heilongjiang Province, China, their genomic fragments were amplified using RT-PCR, cloned and sequenced. Recombination and phylogenetic analyses were conducted with Recombination Detection Package and the maximum-likelihood methods, respectively. The open reading frames of isolates KS4 and KS7 contained 9 186 nucleotides, encoding a polyprotein of 3 061 amino acids. Isolate KS4 shared the highest nucleotide and amino acid identities of 96.9% and 98.4% with isolate Mb112, while isolate KS7 had the highest nucleotide identity of 97.4% with isolate 12-94 and an amino acid identity of 97.8% with isolate SYR-II-Be1. Recombination analysis indicated that isolates KS4 and KS7 were recombinants of isolates N-605 and Oz; the 5'-terminal 2 392 nucleotides of isolate KS4 were from isolate N-605, while the other genomic fragment was from isolate Oz; the 800–2 227 nucleotides and 5 637–8 950 nucleotides of isolate KS7 were from isolate N-605, while the other genomic parts were from isolate Oz. The results of phylogenetic analysis showed that KS4 and KS7 isolates were clustered into group of PVY^{N:O} and type b of PVY^{NTN}, respectively.

Key words: potato virus Y; identity; recombination; phylogenetic analysis

基金项目: 国家自然科学基金(31571984, 31720103912), 泰山学者建设工程(TS201712023)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: gengchaoemail@163.com, xdongli@sdaa.edu.cn

收稿日期: 2018-12-11

马铃薯Y病毒(potato virus Y, PVY)主要侵染马铃薯和烟草等茄科作物(史凤阳等, 2014)。PVY是马铃薯上发生最广泛、危害最严重的病毒, 可导致马铃薯产量和品质降低, 病害严重时减产可达80%以上(高秀妍等, 2009; 陈士华等, 2011)。PVY颗粒呈线状, 长约680~900 nm, 直径11~15 nm; 其基因组为正义单链RNA, 全长约9 700 bp。基因组的5'-端和3'-端均存在非翻译区, 5'-末端共价结合基因组连接蛋白(viral protein genome-linked, VPg), 3'-末端为多聚腺苷酸尾(李向东等, 2006)。编码区编码2个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中一个ORF编码1个大多聚蛋白, 经自身编码的3个蛋白酶, 即第1个蛋白(the first protein, P1)、辅助成分-蛋白酶(helper component-proteinase, HC-Pro)和核内含体蛋白a-蛋白酶(nuclear inclusion body 'a'-proteinase, NIa-Pro)切割成10个成熟蛋白, 另外一个ORF编码包含P1、HC-Pro和P3 N-末端移码融合蛋白(P3 N-terminal frame-shift fusion protein, P3N-PIPO)的1个多聚蛋白(Poque et al., 2017)。

根据基因组是否存在重组, 可将PVY分离物分为重组株系和非重组株系。其中非重组株系包括PVY⁰、PVY^C、PVY^N等(Singh et al., 2008), 重组株系包括由PVY^N和PVY⁰重组得到的PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi}和PVY^{NTN-NW}等(Green et al., 2018)。而根据重组位点的数量和位置不同, 可将PVY^{NTN}分为具有3个重组位点的NTN-a型和具有4个重组位点的NTN-b型; PVY^{N-Wi}含有1个或2个重组位点, 其中1个重组位点在北美称之为PVY^{N:O}(高芳奎等, 2015); PVY^{NTN-NW}具有明显的PVY^{NTN}和PVY^{N-Wi}株系的重组特征, 分为SYR-I、SYR-II和SYR-III型(Chikh Ali et al., 2010a, b)。

黑龙江省是我国马铃薯主产区, 生产的马铃薯具有产量高、退化慢和品质好等优点。PVY是危害黑龙江马铃薯安全生产的重要病毒(高秀妍等, 2009; 刘洪义等, 2014)。本研究拟从一致率、重组和系统发育等方面对2个黑龙江马铃薯PVY分离物KS4和KS7进行株系鉴定, 明确我国黑龙江省马铃薯上PVY的株系类型, 以期为该省马铃薯PVY的早期检测和有效防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品: 感染PVY表现花叶症状的马铃薯叶片样品KS4和KS7于2017年9月采自位于黑龙江

省齐齐哈尔市的黑龙江省农业科学院克山农场, 马铃薯品种为克新13。采集的病样于-80℃保存备用。

试剂及仪器: 大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、植物总RNA提取试剂盒TRIzol、DNA凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; RNA酶抑制剂、dNTP、T4 DNA连接酶、LA Taq DNA聚合酶、不含RNA酶的水、M-MLV反转录酶、pMD18-T克隆载体, 日本TaKaRa公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯。2720 Thermal Cycler PCR仪, 美国Bio-Rad公司; Champ Gel 5000凝胶成像仪, 北京赛智创业科技有限公司; 5424 Eppendorf台式高速离心机, 德国艾本德股份公司; DYY-8C型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯植株总RNA提取及病毒基因组扩增

针对PVY全基因组序列保守区域设计3对引物1-F/1-R、2-F/2-R、3-F/3-R和反转录引物Oligo(dT)₁₈(表1), 分3段扩增所得分离物的ORF区域。引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成。首先利用植物RNA提取试剂盒提取马铃薯样品KS4和KS7的总RNA, 以Oligo(dT)₁₈为引物反转录合成cDNA。将植物总RNA 4 μ L、Oligo(dT)₁₈和任意6个核苷酸组成的随机引物各1 μ L加入PCR管中, 70℃变性10 min后迅速放置冰上2 min。然后加入5 $\times$ M-MLV反转录酶缓冲液2 μ L、200 U/ μ L M-MLV反转录酶0.25 μ L、40 U/ μ L RNA酶抑制剂0.25 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L、不含RNA酶的蒸馏水1 μ L, 30℃处理10 min, 42℃反转录1 h, 70℃钝化反转录酶15 min。将获得的cDNA于-20℃保存备用。其次, 利用合成的cDNA为模板扩增PVY全基因组序列。50 μ L PCR反应体系: 10 $\times$ LA PCR缓冲液5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 2 μ L、5 U/ μ L LA Taq DNA聚合酶0.5 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L、cDNA 2 μ L、ddH₂O 38.5 μ L。反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 不同引物在各自退火温度下(表1)退火30 s, 72℃延伸(延伸时间按1 kb/min计算), 32个循环; 最后72℃延伸10 min, 4℃保存。利用1%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物, 切胶回收后连接到pMD18-T载体上。将连接产物转化DH5 α 感受态细胞, 通过菌落PCR鉴定筛选阳性克隆并送铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。将测序所得序列用DNA-STAR中的SeqMan进行拼接, 得到分离物KS4和KS7的ORF序列。

表1 本研究所用引物信息
Table 1 Primer information in this study

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增片段(nt) Amplified fragment
1-F	AGATCMTCMATGGCAACTTAC	55	1-4 303
1-R	TCATTGTTCTGCCATCAAC		
2-F	TTCAAGAAGCCAACACTG	53	3 872-8 146
2-R	AATAACCCCAGGAYTCTATC		
3-F	CAACAYTTCTCAGATCTTGG	53	7 957-9 187
3-R	TCACAACACCACCCAAG		
Oligo(dT) ₁₈	CAGGATCCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT		

M=A/C, Y=C/T.

1.2.2 PVY分离物的基因组特征及序列一致率分析

利用BioEdit(Alzohairy, 2011)对PVY分离物KS4和KS7的ORF进行翻译,得到多聚蛋白的氨基酸序列。根据PVY蛋白酶识别位点找到11个蛋白P1、HC-Pro、第3个蛋白(the third protein, P3)、P3N-PIPO、第1个6K蛋白(the first 6K protein, 6K1)、细胞质内含体蛋白(cytoplasmic inclusion protein, CI)、第2个6K蛋白(the second 6K protein, 6K2)、VPg、NIa、核内含体蛋白b(nuclear inclusion body 'b', NIb)和衣壳蛋白(coat protein, CP)对应的位置,分析分离物KS4和KS7的基因组特征。

将分离物KS4、KS7的11个蛋白的氨基酸序列和相应的核苷酸序列存为单独的文件,利用BioEdit分析其与GenBank中下载的其它19个代表性PVY分离物编码的11个蛋白的氨基酸序列和相应核苷酸序列的一致率。

1.2.3 PVY分离物KS4和KS7基因组重组分析

为分析PVY分离物KS4和KS7的重组情况,以GenBank序列号为Z21670的马铃薯A病毒(potato virus A, PVA)为外组,以PVY O株系代表性分离物Oz(GenBank登录号EF026074)和N株系代表性分离物N-605(GenBank登录号X97895)的ORF序列作为参比序列。将经Clustal X软件(Larkin et al., 2007)比对分析后的ORF序列导入RDP4程序包中进行重组分析。RDP4程序包(Martin et al., 2015)包含RDP、GENECONV、BootScan、MaxChi、Chimae-ra、SiScan、3Seq共7个程序,当 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ 时认定程序支持重组;当4种以上程序支持重组时,该分离物被认为存在明确重组,否则认为不存在明确重组。

1.2.4 PVY分离物KS4和KS7的系统发育分析

为分析PVY分离物KS4和KS7的系统发育关系,从GenBank中选取其它44个PVY分离物的核苷酸序列作为参考,先用MEGA 6.0(Tamura et al.,

2013)软件中的Clustal W程序进行多重序列比对,然后使用最大似然法(maximum-likelihood, ML)构建基于PVY ORF核苷酸序列的系统发育树。自展值设为1 000,并隐藏小于50%的节点。

2 结果与分析

2.1 PVY分离物KS4和KS7的基因组特征

除5'-UTR和3'-UTR外,分离物KS4和KS7的ORF均有9 186个核苷酸,获得的GenBank登录号分别为MK234698和MK234699,均编码3 061个氨基酸。分离物KS4、KS7都有9个剪切位点,其中P1的剪切位点为F/S,HC-Pro的剪切位点为G/G,NIa-Pro的6个剪切位点依次为Q/R、Q/S、Q/A、Q/G、E/A、Q/A,但分离物KS4的NIa-Pro在NIb和CP间的剪切位点为Q/A,而分离物KS7的NIa-Pro在NIb和CP间的剪切位点为Q/G。小ORF编码的融合蛋白P3N-PIPO中的PIPO均含75个氨基酸。

2.2 PVY分离物KS4和KS7的核苷酸和氨基酸一致率

PVY分离物KS4的ORF核苷酸序列和多聚蛋白氨基酸序列均与PVY分离物Mb112(GenBank登录号AY745491)的一致率最高,分别为96.9%和98.4%,分别与PVY分离物NC57(GenBank登录号DQ309028)和NNP(GenBank登录号AF237963)的一致率最低,为83.7%和85.8%。在PVY编码的11个蛋白中,P1变异最大,其核苷酸与氨基酸序列一致率分别为63.8%~98.8%和55.2%~98.5%;CP最保守,核苷酸与氨基酸序列一致率分别为84.0%~98.1%和89.3%~98.8%(表2和表3)。

PVY分离物KS7的ORF核苷酸序列与PVY分离物12-94(GenBank登录号AJ889866)的一致率最高,为97.4%,其多聚蛋白氨基酸序列与PVY分离物SYR-II-Be1(GenBank登录号AB461452)的一致率最高,为97.8%;ORF核苷酸和多聚蛋白氨基酸序列

均与PVY分离物NC57(GenBank 登录号DQ309028) 分别为63.8%~98.8%和72.1%~94.0%,变异最大;CP 的一致率最低,分别为84.4%和90.3%。在PVY编 码的11个蛋白中,P1的核苷酸与氨基酸序列一致率 和90.2%~98.8%,最为保守(表4和表5)。

表2 分离物KS4与GenBank中19个PVY分离物ORF及各蛋白基因的核苷酸序列一致率
Table 2 Nucleotide sequence identities of ORF and each gene between KS4 and other 19 PVY isolates in GenBank %

分离物 Isolate	株系 Strain	登录号 Accession number	开放阅 读框 ORF	P1	HC- Pro	P3	P3N- PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	Nla- Pro	NIb	CP
Mont	N	AY884983	88.2	98.5	81.8	87.5	82.6	82.6	83.4	82.0	83.8	80.8	84.9	89.6
N-605	N	X97895	88.2	98.4	98.7	87.3	82.2	82.6	83.3	82.0	84.7	80.8	85.3	89.7
Hun-NTN	NTN	M95491	92.4	98.5	98.6	94.9	98.2	99.3	96.0	99.3	86.7	81.0	84.9	91.0
PVY-AST	NTN	JF928460	92.4	98.0	98.6	94.9	98.6	98.7	95.7	99.3	86.8	80.7	84.8	84.9
PB312	NTN	EF026075	92.4	98.2	98.6	94.9	98.6	99.3	95.9	98.7	86.7	81.0	84.9	84.0
SYR-NB-16	NTN	AB270705	92.9	98.2	98.3	94.7	95.5	98.7	95.8	98.7	86.8	81.0	84.9	97.3
ShX14	NTN	KJ634024	93.1	97.4	98.5	95.8	97.7	97.4	95.9	97.4	86.7	81.1	85.3	97.5
Gr99	NTN	AJ890343	91.0	88.4	96.4	94.1	98.6	97.4	95.7	97.4	86.8	81.1	84.7	90.7
12-94	NTN	AJ889866	91.3	88.3	98.3	94.6	98.6	98.7	95.6	97.4	87.0	80.4	84.9	84.9
SYR-II-Be1	NTN	AB461452	92.1	88.7	98.2	94.7	98.2	99.3	95.8	99.3	86.7	80.8	85.0	97.8
SYR-II-DrH	NTN	AB461453	92.4	88.7	98.4	94.6	98.6	98.7	95.7	98.7	87.0	80.6	86.8	98.0
L56	N:O	AY745492	96.9	98.7	98.3	94.6	98.6	99.3	96.4	99.3	96.2	96.8	96.2	98.1
Mb112	N:O	AY745491	96.9	98.8	98.2	94.7	98.6	99.3	96.2	99.3	96.0	96.4	96.4	98.0
PN10A	N:O	DQ008213	95.9	88.9	98.6	95.0	98.6	97.4	96.1	99.3	95.9	96.5	96.2	96.3
Wilga5	N:O	AJ890350	95.7	88.7	98.6	94.4	97.3	99.3	96.0	99.3	96.0	96.5	96.0	97.8
O-139	O	U09509	91.5	71.9	82.1	94.6	98.2	96.7	95.7	97.4	95.7	96.4	96.0	96.5
SASA-110	O	AJ585195	91.9	72.1	82.2	94.9	99.1	98.7	95.7	97.4	96.4	84.8	96.9	97.2
NC57	C	DQ309028	83.7	63.8	81.2	84.7	74.6	91.0	87.6	88.4	89.1	84.8	84.2	90.6
NNP	C	AF237963	85.1	72.1	80.5	87.0	88.1	89.1	87.3	85.8	88.4	81.5	87.0	91.8

P1: 第1个蛋白; HC-Pro: 辅助成分-蛋白酶; P3: 第3个蛋白; P3N-PIPO: P3 N-末端移码融合蛋白; 6K1: 第1个6K蛋白; CI: 细胞质内含体蛋白; 6K2: 第2个6K蛋白; VPg: 病毒基因组连接蛋白; Nla-Pro: 核内含体蛋白a-蛋白酶; NIb: 核内含体蛋白b; CP: 衣壳蛋白。P1: The first protein; HC-Pro: helper component-proteinase; P3: the third protein; P3N-PIPO: P3 N-terminal frame-shift fusion protein; 6K1: the first 6K protein; CI: cytoplasmic inclusion protein; 6K2: the second 6K protein; VPg: viral genome-linked protein; Nla-Pro: nuclear inclusion body ‘a’-proteinase; NIb: nuclear inclusion body ‘b’; CP: coat protein.

表3 分离物KS4与GenBank中19个PVY分离物多聚蛋白及各蛋白的氨基酸序列一致率
Table 3 Amino acid sequence identities of polyproteins and each protein between KS4 and other 19 PVY isolates in GenBank %

分离物 Isolate	株系 Strain	登录号 Accession number	多聚蛋白 Polyprotein	P1	HC- Pro	P3	P3N- PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	Nla- Pro	NIb	CP
Mont	N	AY884983	95.0	98.2	99.3	93.1	72.0	86.5	93.3	90.3	94.1	93.4	95.5	94.0
N-605	N	X97895	94.8	98.2	99.1	92.8	72.0	84.6	93.2	90.3	94.6	93.8	95.1	94.0
Hun-NTN	NTN	M95491	96.5	96.8	98.9	98.3	96.0	100.0	97.1	100.0	94.6	93.4	95.1	93.2
PVY-AST	NTN	JF928460	96.5	97.5	99.3	98.3	97.3	100.0	96.5	100.0	94.6	93.4	94.9	93.6
PB312	NTN	EF026075	96.7	98.2	99.3	98.6	97.3	100.0	97.4	100.0	94.6	93.4	94.9	93.6
SYR-NB-16	NTN	AB270705	97.1	98.2	99.1	98.3	93.3	100.0	97.4	100.0	94.1	93.8	95.5	97.3
ShX14	NTN	KJ634024	96.9	97.5	99.1	98.3	96.0	96.1	97.0	98.0	94.6	93.4	95.5	98.1
Gr99	NTN	AJ890343	94.8	85.5	98.9	96.1	93.3	96.1	96.6	98.0	94.6	93.8	93.8	93.6
12-94	NTN	AJ889866	95.1	85.5	98.6	98.0	97.3	100.0	96.8	98.0	94.6	92.6	94.7	93.6
SYR-II-Be1	NTN	AB461452	96.0	86.2	99.1	98.0	96.0	100.0	97.4	100.0	94.1	93.8	95.5	98.1
SYR-II-DrH	NTN	AB461453	96.3	86.6	99.3	98.6	97.3	100.0	97.3	98.0	94.6	93.8	96.5	98.1
L56	N:O	AY745492	98.3	98.2	99.1	98.0	97.3	100.0	97.3	100.0	99.4	97.5	99.0	98.5
Mb112	N:O	AY745491	98.4	98.5	99.1	98.3	97.3	100.0	97.1	100.0	99.4	97.5	99.4	98.5

续表3 Continued

分离物 Isolate	株系 Strain	登录号 Accession number	多聚蛋白 Polyprotein	P1	HC- Pro	P3	P3N- PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	Nla- Pro	NIb	CP
PN10A	N:O	DQ008213	97.3	86.2	99.1	98.6	96.0	98.0	97.3	100.0	99.4	97.5	99.2	98.8
Wilga5	N:O	AJ890350	97.0	85.9	98.6	97.5	93.3	100.0	97.1	100.0	99.4	96.3	99.2	98.5
O-139	O	U09509	93.6	69.3	90.1	98.3	97.3	98.0	96.6	100.0	97.8	95.4	98.0	97.0
SASA-110	O	AJ585195	94.1	69.7	90.5	98.3	98.6	100.0	96.8	98.0	98.9	96.3	99.0	97.7
NC57	C	DQ309028	89.1	55.2	90.3	90.4	65.3	100.0	94.7	92.3	96.2	90.9	92.1	92.5
NNP	C	AF237963	85.8	87.5	81.0	88.8	87.7	89.7	88.8	85.2	84.3	81.6	83.4	89.3

P1: 第1个蛋白; HC-Pro: 辅助成分-蛋白酶; P3: 第3个蛋白; P3N-PIPO: P3 N-末端移码融合蛋白; 6K1: 第1个6K蛋白; CI: 细胞质内含体蛋白; 6K2: 第2个6K蛋白; VPg: 病毒基因组连接蛋白; Nla-Pro: 核内含体蛋白a-蛋白酶; NIb: 核内含体蛋白b; CP: 衣壳蛋白。P1: The first protein; HC-Pro: helper component-proteinase; P3: the third protein; P3N-PIPO: P3 N-terminal frame-shift fusion protein; 6K1: the first 6K protein; CI: cytoplasmic inclusion protein; 6K2: the second 6K protein; VPg: viral genome-linked protein; Nla-Pro: nuclear inclusion body 'a'-proteinase; NIb: nuclear inclusion body 'b'; CP: coat protein.

表4 分离物KS7与GenBank中19个PVY分离物ORF及各蛋白基因的核苷酸序列一致率

Table 4 Nucleotide sequence identities of ORF and each gene between KS7 and other 19 PVY isolates in GenBank %

分离物 Isolate	株系 Strain	登录号 Accession number	开放阅 读框 ORF	P1	HC- Pro	P3	P3N- PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	Nla- Pro	NIb	CP
Mont	N	AY884983	91.0	98.5	81.8	87.5	82.6	82.6	83.4	82.0	83.8	80.8	84.9	89.6
N-605	N	X97895	91.1	98.4	98.7	87.3	82.2	82.6	83.3	82.0	84.7	80.8	85.3	89.7
Hun-NTN	NTN	M95491	96.9	98.5	98.6	94.9	98.2	99.3	99.4	99.3	86.7	81.0	84.9	91.0
PVY-AST	NTN	JF928460	96.9	74.5	99.1	99.2	99.1	99.3	99.2	100.0	99.4	99.7	99.2	99.2
PB312	NTN	EF026075	96.9	74.2	99.1	99.4	99.1	100.0	99.3	99.3	99.2	100.0	99.4	99.4
SYR-NB-16	NTN	AB270705	96.3	98.2	98.3	94.7	95.5	98.7	95.8	98.7	86.8	81.0	84.9	97.3
ShX14	NTN	KJ634024	95.4	97.4	98.5	95.8	97.7	97.4	95.9	97.4	86.7	81.1	85.3	97.5
Gr99	NTN	AJ890343	96.7	88.4	96.4	94.1	98.6	97.4	95.7	97.4	86.8	81.1	84.7	90.7
12-94	NTN	AJ889866	97.4	83.0	98.3	98.7	99.1	99.3	99.1	98.0	99.2	99.0	99.3	99.3
SYR-II-Be1	NTN	AB461452	97.1	83.0	98.9	98.8	98.6	100.0	99.2	100.0	99.1	99.7	99.5	99.5
SYR-II-DrH	NTN	AB461453	96.6	88.7	98.4	94.6	98.6	98.7	95.7	98.7	87.0	80.6	86.8	98.0
L56	N:O	AY745492	91.5	98.7	98.3	94.6	98.6	99.3	96.4	99.3	96.2	96.8	96.2	98.1
Mb112	N:O	AY745491	91.5	98.8	98.2	94.7	98.6	99.3	96.2	99.3	96.0	96.4	96.4	98.0
PN10A	N:O	DQ008213	95.9	83.0	98.8	96.9	97.3	98.0	98.2	100.0	87.5	81.1	84.9	84.9
Wilga5	N:O	AJ890350	92.1	88.7	98.6	94.4	97.3	99.3	96.0	99.3	96.0	96.5	96.0	97.8
O-139	O	U09509	90.0	71.9	82.1	94.6	98.2	96.7	95.7	97.4	95.7	96.4	96.0	96.5
SASA-110	O	AJ585195	90.2	72.1	82.2	94.9	99.1	98.7	95.7	97.4	96.4	84.8	96.9	97.2
NC57	C	DQ309028	84.4	63.8	81.2	84.7	74.6	91.0	87.6	88.4	89.1	84.8	84.2	90.6
NNP	C	AF237963	90.9	70.4	87.7	90.4	78.9	94.2	94.9	90.3	91.4	93.0	96.9	94.7

P1: 第1个蛋白; HC-Pro: 辅助成分-蛋白酶; P3: 第3个蛋白; P3N-PIPO: P3 N-末端移码融合蛋白; 6K1: 第1个6K蛋白; CI: 细胞质内含体蛋白; 6K2: 第2个6K蛋白; VPg: 病毒基因组连接蛋白; Nla-Pro: 核内含体蛋白a-蛋白酶; NIb: 核内含体蛋白b; CP: 衣壳蛋白。P1: The first protein; HC-Pro: helper component-proteinase; P3: the third protein; P3N-PIPO: P3 N-terminal frame-shift fusion protein; 6K1: the first 6K protein; CI: cytoplasmic inclusion protein; 6K2: the second 6K protein; VPg: viral genome-linked protein; Nla-Pro: nuclear inclusion body 'a'-proteinase; NIb: nuclear inclusion body 'b'; CP: coat protein.

2.3 PVY分离物KS4和KS7的重组类型

通过RDP4软件进行重组分析, RDP、GENE-CONV、BootScan、MaxChi、Chimaera、SiScan和3Seq共7种程序均支持分离物KS4由N-605和Oz这2个分离物重组产生, RDP、GENECONV、BootScan、MaxChi、Chimaera和3Seq共6种程序均支持分离物

KS7由N-605和Oz这2个分离物重组产生(表6)。分离物KS4在2 392核苷酸处存在1个重组位点, 位于P3编码区内; 5'-端的2 392个核苷酸来自分离物N-605, 其余核苷酸则来自分离物Oz。分离物KS7在800、2 227、5 637和8 950核苷酸处存在4个重组位点, 3个分别位于P1、VPg、CP编码区内, 1个位于

HC-Pro/P3 编码区间;分离物 KS7 基因组的第 800~2 227 个核苷酸和第 5 637~8 950 个核苷酸来自分离物 N-605,其余核苷酸则来自分离物 Oz(图 1)。对分离物 Mb112、12-94 的序列进行重组分析发现,分离物 KS4 与 Mb112 的重组类型相似,分离物 KS7 与 12-94 的重组类型相似(图 1)。

表 5 分离物 KS7 与 GenBank 中 19 个 PVY 分离物多聚蛋白及各蛋白的氨基酸序列一致率
Table 5 Amino acid sequence identities of polyproteins and each protein between KS7 and other 19 PVY isolates in GenBank %

分离物 Isolate	株系 Strain	登录号 Accession number	多聚蛋白 Polyprotein	P1	HC- Pro	P3	P3N- PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	Nla- Pro	NIb	CP
Mont	N	AY884983	95.0	73.2	100.0	92.6	72.0	86.5	95.8	90.3	97.8	99.5	99.8	98.8
N-605	N	X97895	94.8	72.5	99.7	92.3	72.0	84.6	95.7	90.3	98.9	100	99.4	98.1
Hun-NTN	NTN	M95491	96.9	72.8	99.5	99.4	96.0	100.0	99.6	100.0	98.9	99.5	99.4	98.1
PVY-AST	NTN	JF928460	96.9	73.2	100.0	99.4	97.3	100.0	99.0	100.0	98.9	99.5	99.6	98.5
PB312	NTN	EF026075	97.1	73.2	100.0	99.7	97.3	100.0	100.0	100.0	98.9	99.5	99.6	98.5
SYR-NB-16	NTN	AB270705	96.7	72.5	99.7	99.4	93.3	100.0	100.0	100.0	98.4	100.0	99.8	94.0
ShX14	NTN	KJ634024	96.2	72.5	99.7	96.9	93.3	96.1	99.5	98.0	98.9	99.5	99.4	95.5
Gr99	NTN	AJ890343	97.0	82.7	99.1	95.6	90.6	96.1	99.2	98.0	98.9	100.0	98.4	98.5
12-94	NTN	AJ889866	97.6	83.4	99.3	99.1	97.3	100.0	99.3	98.0	98.9	98.3	99.4	98.5
SYR-II-Be1	NTN	AB461452	97.8	83.4	99.7	99.1	96.0	100.0	100.0	100.0	98.4	100.0	99.8	95.5
SYR-II-DrH	NTN	AB461453	97.3	83.0	100.0	99.7	97.3	100.0	99.8	98.0	98.9	100.0	97.6	94.0
L56	N:O	AY745492	95.0	72.8	99.7	99.1	97.3	100.0	99.8	100.0	94.1	93.0	94.4	95.1
Mb112	N:O	AY745491	95.0	72.8	99.7	99.4	97.3	100.0	99.6	100.0	94.1	93.0	94.7	95.1
PN10A	N:O	DQ008213	95.8	83.4	99.7	98.0	93.3	98.0	99.8	100.0	94.1	93.0	94.6	94.7
Wilga5	N:O	AJ890350	95.7	83.4	99.3	98.6	93.3	100.0	99.6	100.0	94.1	91.8	94.6	94.3
O-139	O	U09509	94.8	94.0	90.3	98.3	94.6	98.0	99.2	100.0	92.5	92.2	93.6	93.2
SASA-110	O	AJ585195	95.2	93.3	90.7	98.0	96.0	100.0	99.3	98.0	93.6	92.6	94.7	94.0
NC57	C	DQ309028	90.3	72.1	90.5	90.4	62.6	100.0	97.3	92.3	93.0	90.1	89.7	90.2
NNP	C	AF237963	92.3	87.6	87.9	89.8	76.3	94.2	97.4	90.3	89.8	93.0	94.7	92.1

P1: 第 1 个蛋白; HC-Pro: 辅助成分-蛋白酶; P3: 第 3 个蛋白; P3N-PIPO: P3 N-末端移码融合蛋白; 6K1: 第 1 个 6K 蛋白; CI: 细胞质内含体蛋白; 6K2: 第 2 个 6K 蛋白; VPg: 病毒基因组连接蛋白; Nla-Pro: 核内含体蛋白 a-蛋白酶; NIb: 核内含体蛋白 b; CP: 衣壳蛋白。P1: The first protein; HC-Pro: helper component-proteinase; P3: the third protein; P3N-PIPO: P3 N-terminal frame-shift fusion protein; 6K1: the first 6K protein; CI: cytoplasmic inclusion protein; 6K2: the second 6K protein; VPg: viral genome-linked protein; Nla-Pro: nuclear inclusion body ‘a’-proteinase; NIb: nuclear inclusion body ‘b’; CP: coat protein.

表 6 RDP4 软件中 7 个程序对分离物 KS4 和 KS7 重组分析的平均 P 值
Table 6 Recombination analysis of isolates KS4 and KS7 with average P-value by seven programs of RDP4

程序 Program	KS4	KS7	
	重组区域 Recombinant region	重组区域 1 Recombinant region 1	重组区域 2 Recombinant region 2
	1-2 392 nt	800-2 227 nt	5 637-8 950 nt
RDP	3.131×10 ⁻¹⁷⁰	3.656×10 ⁻¹²⁵	1.052×10 ⁻¹²⁰
GENECONV	1.415×10 ⁻¹⁶⁷	6.876×10 ⁻¹²⁰	4.004×10 ⁻¹⁰⁰
BootScan	1.448×10 ⁻¹⁷³	8.696×10 ⁻¹²²	7.319×10 ⁻¹²²
MaxChi	1.654×10 ⁻⁵¹	2.515×10 ⁻³⁸	1.623×10 ⁻⁵⁵
Chimaera	2.961×10 ⁻⁵²	6.692×10 ⁻³⁹	5.332×10 ⁻³¹
SiScan	5.364×10 ⁻²⁰	—	—
3Seq	3.330×10 ⁻¹⁵	2.220×10 ⁻¹⁶	2.220×10 ⁻¹⁶

2.4 PVY 分离物 KS4 和 KS7 的系统发育分析

系统发育分析结果表明,PVY 分离物被分成 12 个分支,其中分离物 KS4 被聚类到 PVY 的 N:O 株

系,与 N:O 型的 Mb112、L56 等分离物聚成一簇,分离物 KS7 与 NTN 株系 b 型的 12-94、Gr99 等分离物聚成一簇,属于 NTN-b 型(图 2)。

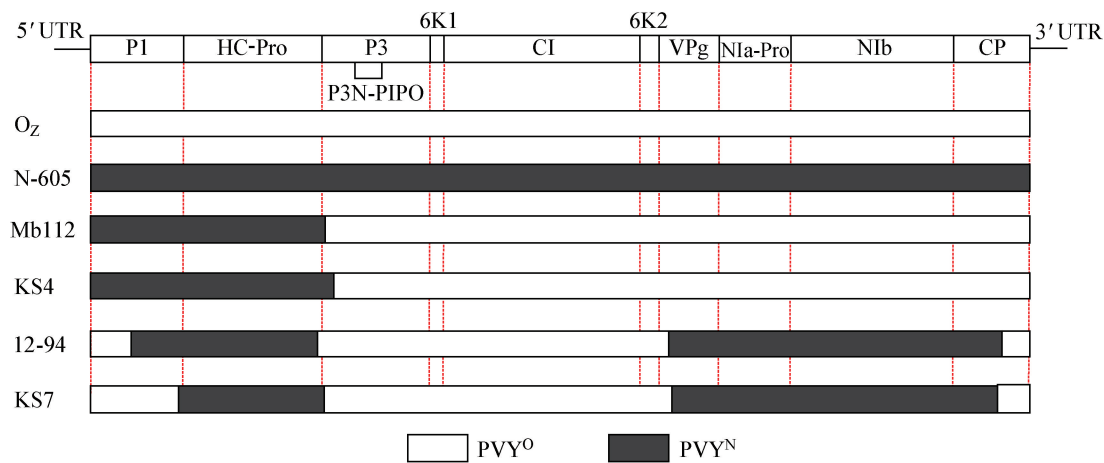


图1 PVY分离物KS4和KS7的基因组重组结构图

Fig. 1 Genomic recombination structure of PVY isolates KS4 and KS7

5'UTR: 5'端非翻译区; P1: 第1个蛋白; HC-Pro: 辅助成分-蛋白酶; P3: 第3个蛋白; P3N-PIPO: P3 N-末端移码融合蛋白; 6K1: 第1个6K蛋白; CI: 细胞质内含体蛋白; 6K2: 第2个6K蛋白; VPg: 病毒基因组连接蛋白; NIa-Pro: 核内含体蛋白a-蛋白酶; NIb: 核内含体蛋白b; CP: 衣壳蛋白; 3'UTR: 3'端非翻译区。5'UTR: 5' Untranslated region; P1: the first protein; HC-Pro: helper component-proteinase; P3: the third protein; P3N-PIPO: P3 N-terminal frame-shift fusion protein; 6K1: the first 6K protein; CI: cytoplasmic inclusion protein; 6K2: the second 6K protein; VPg: viral genome-linked protein; NIa-Pro: nuclear inclusion body 'a'-proteinase; NIb: nuclear inclusion body 'b'; CP: coat protein; 3'UTR: 3' untranslated region.

3 讨论

PVY是我国马铃薯上的主要病毒,迄今已发现侵染我国马铃薯的PVY有PVY^O、PVY^{N:O}、PVY^{N-Wi}、PVY^{NTN}、PVY^{NTN-NW}(SYR-I和SYR-II型)和PVY^E等株系。以前PVY的株系鉴定主要依靠生物学和血清学方法,现在更多是通过对单基因或多基因序列进行系统发育分析。如陈士华等(2010)采用CP基因和PI基因序列联合分析方法,在河南省马铃薯中发现了PVY^{N:O}和PVY^{N-Wi}株系;在黑龙江省马铃薯上发现了PVY^{NTN}株系,在贵州省和山西省马铃薯上发现了PVY^{N:O}株系(陈士华等,2011);沈林林等(2016)采用PI、VPg和CP基因序列联合分析方法,在福建省马铃薯上发现了PVY^{NTN-NW}株系SYR-I和SYR-II型、PVY^{N-Wi}和PVY^E株系;高芳奎等(2015)和蔡伟等(2017)通过全基因组序列分析,发现中国马铃薯PVY分离物存在PVY^{N-Wi}(N-Wi型)、PVY^{NTN}(NTN-a)和PVY^{NTN-NW}(SYR-I型)株系。通过全基因组分析鉴定中国马铃薯PVY株系的研究相对较少。本试验通过测定我国黑龙江省马铃薯PVY分离物KS4和KS7的全部ORF序列,经过重组和系统发育分析证明黑龙江省马铃薯PVY分离物KS4为PVY^{N:O}株系,分离物KS7为PVY^{NTN}株系NTN-b型。侵染黑龙江马铃薯的PVY株系还包括PVY^O、PVY^N、PVY^{N-Wi}、PVY^{N:O}、PVY^{NTN-NW}、PVY^{NTN}SYR-I、

PVY^{NTN}SYR-II等(刘洪义等,2014;尚慧等,2018; Bai et al., 2019),这是黑龙江省马铃薯上首次报道PVY^{NTN}株系b型分离物。

重组有利于提高病毒的适应性(Valli et al., 2007)。重组型的PVY^{N:O}和PVY^{NTN}株系比普通株系PVY^O更容易被蚜虫传播,已经成为美国马铃薯PVY的优势株系(Mondal & Gray, 2017)。本研究中的PVY分离物KS4和KS7都是重组体,分离物KS4和同属于PVY^{N:O}株系的分离物Mb112都只有1个重组位点,但二者的重组位置不同:分离物Mb112的重组位点在HC-Pro和P3编码区之间,而分离物KS4的重组位点在P3编码区;分离物KS7和同属于PVY^{NTN}株系NTN-b型的分离物12-94都有4个重组位点,其中3个相同,不同的是分离物KS7在P1和HC-Pro编码区之间靠近P1编码区3'-端有1个重组位点(800 nt),而分离物12-94在P1编码区内有1个重组位点。因此,本研究的分离物KS4和KS7分别代表新的PVY重组类型。

PCR技术是快速检测植物病毒的有效方法。针对PVY不同重组类型可以设计合适的引物,通过单重或多重PCR检测PVY不同株系(Kogovšek et al., 2008; Chikh Ali et al., 2010b)。本研究中分离物KS7与其它NTN-b型分离物的重组位点不同,下步将进一步优化PVY的PCR检测体系,以免造成漏检。

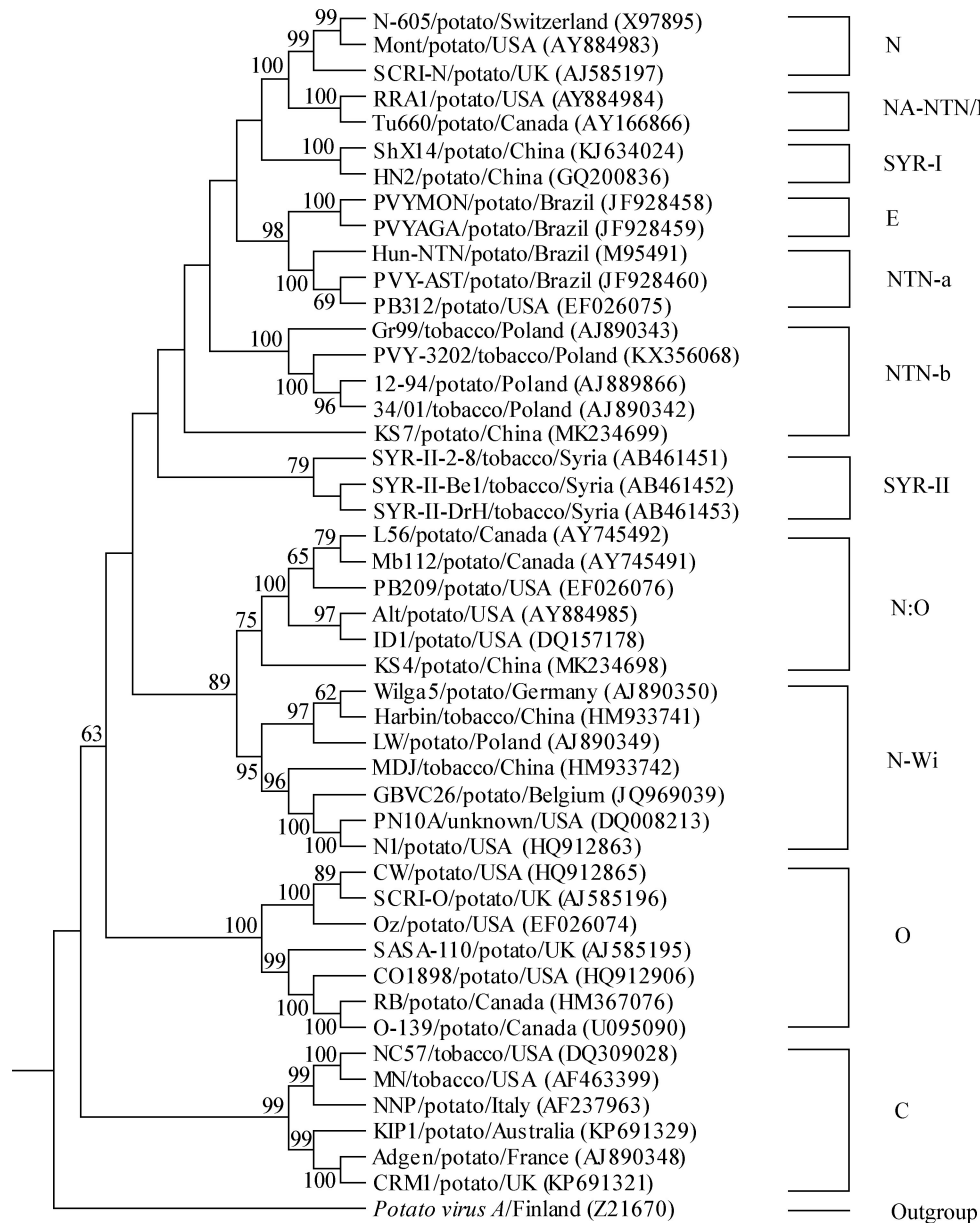


图2 基于ORF序列利用最大似然法构建分离物KS4和KS7及其它PVY分离物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of KS4, KS7 and other PVY isolates constructed with ORF sequences by using maximum-likelihood method

参考文献 (References)

- Alzohairy AM. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1): 60–61
- Bai YJ, Han SX, Gao YL, Zhang W, Fan GQ, Qiu CL, Nie XZ, Wen JZ. 2019. Genetic diversity of *Potato virus Y* in potato production areas in Northeast China. *Plant Disease*, 103(2): 289–297
- Cai W, Yang HK, Shen JG, Zou WC, Gao FL. 2017. Determination of *Potato virus Y* strain in China based on phylogenetic and recombination analyses of the complete genomic sequences. *Acta Laser Biology Sinica*, 26(4): 350–359 (in Chinese) [蔡伟, 杨宏凯, 沈建国, 邹文超, 高芳磊. 2017. 全基因组序列的系统发育与重组分析鉴定我国马铃薯Y病毒株系. *激光生物学报*, 26(4): 350–359]
- Chen SH, Liu XL, Zhang XT, Wu XQ. 2010. Identification and molecular characters of the PVY strains with high pathogenicity in Henan. *Journal of Henan Agricultural University*, 44(4): 443–447 (in Chinese) [陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 2010. 河南PVY高致病性株系的发现及其分子特征研究. *河南农业大学学报*, 44(4): 443–447]
- Chen SH, Liu XL, Zhang XT, Wu XQ. 2011. Study on the PVY strain differentiation and identification of some potato producing areas in China. *Journal of Henan Agricultural University*, 45(5): 548–551 (in Chinese) [陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 2011. 中国部分马铃薯产区马铃薯Y病毒(PVY)的株系分化与鉴定. *河南农业大学学报*, 45(5): 548–551]

- Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT. 2010a. PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathology*, 59(1): 31–41
- Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T. 2010b. The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 165(1): 15–20
- Gao FL, Chang F, Shen JG, Xie LH, Zhan JS. 2015. Complete genome analysis of PVY^{NTN-NW} recombinant isolate from Yulin of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(2): 270–279 (in Chinese) [高芳奎, 常飞, 沈建国, 谢联辉, 詹家绥. 2015. PVY^{NTN-NW} 榆林分离物的全基因组序列测定与分析. *中国农业科学*, 48(2): 270–279]
- Gao XY, Gao YL, Geng HW, Zhang W, Fan GQ, Bai YJ, Lü WH, Jiang XF. 2009. Identification of a *Potato virus Y* isolates from Heilongjiang. *Chinese Potato Journal*, 23(1): 11–14 (in Chinese) [高秀妍, 高艳玲, 耿宏伟, 张威, 范国权, 白艳菊, 吕文河, 蒋希峰. 2009. 马铃薯Y病毒黑龙江分离物株系鉴定. *中国马铃薯*, 23(1): 11–14]
- Green KJ, Brown CJ, Karasev AV. 2018. Genetic diversity of *Potato virus Y* (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Archives of Virology*, 163(1): 23–32
- Kogovšek P, Gow L, Pompe-Novak M, Gruden K, Foster GD, Boonham N, Ravnika M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods*, 149(1): 1–11
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948
- Li XD, Yu XQ, Gu QS, Liu JL, Zhu XP, Guo XQ. 2006. Advances on functional genomics of potyviruses. *Shandong Science*, 19(3): 1–6 (in Chinese) [李向东, 于晓庆, 古勤生, 刘金亮, 竺晓平, 郭兴启. 2006. 马铃薯Y病毒属病毒基因功能研究进展. *山东科学*, 19(3): 1–6]
- Liu HY, Liang WS, Liu ZM, Zhang HX, Yang LQ. 2014. Identification of *Potato virus Y* strains in infected potato plants from some places of Heilongjiang Province. *Journal of Northeast Agricultural University*, 45(1): 47–52 (in Chinese) [刘洪义, 梁五生, 刘忠梅, 张洪祥, 杨立群. 2014. 黑龙江省部分地区马铃薯Y病毒株系检测. *东北农业大学学报*, 45(1): 47–52]
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1(1): vev003
- Mondal S, Gray SM. 2017. Sequential acquisition of *Potato virus Y* strains by *Myzus persicae* favors the transmission of the emerging recombinant strains. *Virus Research*, 241: 116–124
- Poque S, Wu HW, Huang CH, Cheng HW, Hu WC, Yang JY, Wang D, Yeh SD. 2017. Potyviral gene-silencing suppressor HC-Pro interacts with salicylic acid (SA)-binding protein 3 to weaken SA-mediated defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1): 86–100
- Shang H, Han SX, Gao YL, Zhang W, Fan GQ, Shen Y, Nie XZ, Lü WH, Bai YJ. 2018. Identification of recombinant strain PVY by qRT-PCR technique. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 31(2): 238–244 (in Chinese) [尚慧, 韩树鑫, 高艳玲, 张威, 范国权, 申宇, 聂先舟, 吕文河, 白艳菊. 2018. 利用qRT-PCR技术对PVY重组株系的鉴定. *西南农业学报*, 31(2): 238–244]
- Shen LL, Zou WC, Gao FL, Zhan JS. 2016. Strain composition of *Potato virus Y* in Fujian Province detected with the concatenated sequence approach. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(20): 3918–3926 (in Chinese) [沈林林, 邹文超, 高芳奎, 詹家绥. 2016. 采用多基因联合方法鉴定福建长乐和福清产区马铃薯Y病毒株系组成. *中国农业科学*, 49(20): 3918–3926]
- Shi FY, Gao FL, Shen JG, Chang F, Zhan JS. 2014. Sequence variation of *PI* gene in *Potato virus Y* isolated from Fujian Province. *Hereditas*, 36(7): 713–722 (in Chinese) [史凤阳, 高芳奎, 沈建国, 常飞, 詹家绥. 2014. 马铃薯Y病毒福建分离物PI基因的分子变异和结构特征. *遗传*, 36(7): 713–722]
- Singh RP, Valkonen JPT, Gray SM, Boonham N, Jones RAC, Kerlan C, Schubert J. 2008. Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153(1): 1–13
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729
- Valli A, López-Myoya JJ, García JA. 2007. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, 88(Pt3): 1016–1028

(责任编辑:李美娟)