

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2022)04-0322-10

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2022.04.005

病虫害防治

## 马铃薯帚顶病毒基因组克隆与侵染性克隆构建

刘野<sup>1</sup>, 高艳玲<sup>2</sup>, 刘佳慧<sup>1</sup>, 方月<sup>1</sup>, 马廷帅<sup>1</sup>, 毛彦芝<sup>2</sup>, 张丽莉<sup>1</sup>, 白艳菊<sup>2</sup>, 程晓非<sup>1\*</sup>

(1. 寒地粮食作物种质创新与生理生态教育部重点实验室/东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:** 马铃薯帚顶病毒(Potato mop-top virus, PMTV)能严重影响马铃薯(*Solanum tuberosum*)的产量和品质, 是中国进境植物一类检疫性有害生物。中国广东、云南、四川等地马铃薯上曾零星检测到该病毒的存在。文中报道了一株采自河北省PMTV马铃薯分离物的全基因组序列, 分析了该分离物与其他PMTV分离物的遗传进化关系。通过酵母同源重组法构建了该分离物的侵染性克隆, 并在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)和马铃薯上验证了该分离物的侵染性。研究丰富了对侵入中国的PMTV的了解, 为进一步开展PMTV的致病机理、马铃薯抗病机制以及粉痂菌(*Spongospora subterranea*)传毒机制奠定了基础。

**关键词:** 马铃薯帚顶病毒; 侵染性克隆; 全基因组; 河北分离物; 序列分析

## Cloning of Potato Mop-top Virus Genome and Construction of Infectious cDNA Clone

LIU Ye<sup>1</sup>, GAO Yanling<sup>2</sup>, LIU Jiahui<sup>1</sup>, FANG Yue<sup>1</sup>, MA Tingshuai<sup>1</sup>, MAO Yanzhi<sup>2</sup>, ZHANG Lili<sup>1</sup>, BAI Yanju<sup>2</sup>, CHENG Xiaofei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Germplasm Innovation and Physiology and Ecology of Food Crops in Cold Regions, Ministry of Education/

College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Industrial Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

**Abstract:** Potato mop-top virus (PMTV) can seriously affect the yield and quality of potato (*Solanum tuberosum*) and it is included in the list of quarantine pests of imported plants of the People's Republic of China. PMTV has been sporadically detected on potatoes from Guangdong, Yunnan, and Sichuan provinces in China. The full genome sequence isolated from a PMTV potato tuber collected in Hebei Province was reported and the genetic evolutionary relationships of this PMTV isolate and other ones were analyzed. The infectious clone of this PMTV isolate was constructed with the yeast homologous recombination method and its infectivity was verified on *Nicotiana benthamiana* and potato. This study would increase the knowledge about the invasion of PMTV to China and lay the foundation for studying the pathogenesis of PMTV, the resistance mechanism of potatoes, and the transmission mechanism of powdery mildew (*Spongospora subterranea*).

**Key Words:** potato mop-top virus; infectious cDNA clone; genome-wide; Hebei isolate; sequence analysis

收稿日期: 2022-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31671998); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2018002)。

作者简介: 刘野(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒学。

\*通信作者(Corresponding author): 程晓非, 教授, 研究方向为植物病毒学, E-mail: xfcheng@neau.edu.cn。

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是世界第四大粮食作物, 2019年全球马铃薯产量高达3.68亿t, 中国是马铃薯产量最大的国家, 年产量为9 000万t<sup>[1]</sup>。病毒病是影响马铃薯产量与品质的重要因素之一, 也是马铃薯种薯退化的主要原因。据报道有40余种植物病毒可侵染马铃薯, 并造成危害<sup>[2]</sup>。马铃薯帚顶病毒(Potato mop-top virus, PMTV)是帚状病毒科(Virgaviridae)马铃薯帚顶病毒属(*Pomovirus*)的代表成员<sup>[3]</sup>。感染PMTV的马铃薯植株上部叶片出现倒V型黄化斑纹, 基部叶片出现不规则黄色斑块或线状纹, 块茎出现坏死弧纹或条纹, 严重影响马铃薯的产量、品质及商业价值<sup>[4]</sup>。PMTV主要通过块茎、粉痂菌(*Spongospora subterranea*)传播, 也可通过机械摩擦传播<sup>[5]</sup>。PMTV曾在广东、云南和四川等地的块茎中被零星检测到, 但尚无在中国马铃薯产区大面积流行和传播的报道<sup>[6-8]</sup>。鉴于该病毒的强致病性和危害性, 中国已将其列入进境植物检疫禁止进境物名录。PMTV的病毒粒子为直杆状, 基因组由三条正义单链RNA组成, 根据长度分别命名为RNA1、RNA2和RNA3<sup>[7]</sup>。三条RNA的3'末端没有mRNA类似的多聚腺苷酸尾巴, 但含有一个类似tRNA的结构<sup>[9]</sup>。RNA1长约6.1 kb, 编码两个复制相关蛋白; RNA2长约3.1 kb, 编码两个病毒外壳蛋白(Coat protein, CP); RNA3长约2.9 kb, 编码四个阅读框(Open reading frame, ORF), 其中ORF1-3部分重叠, 组成保守的三基因盒(Triple-gene block, TGB), 编码3个运动蛋白, ORF4编码一个具有RNA沉默抑制子功能的富含半胱氨酸蛋白(Cysteine-rich protein, CRP)<sup>[10]</sup>。本研究报道了一株采自河北省马铃薯块茎的PMTV全基因组序列, 对其遗传进化进行了分析, 并构建了其侵染性克隆, 以期为研究PMTV的致病和传播机制、马铃薯的抗病机制以及建立科学防控策略提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

感染PMTV的马铃薯块茎采自河北省张北县(由黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯资源研究

所提供)。

#### 1.1.2 菌株与载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Y2H Gold、农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) GV3101均由本实验保存; pCB301-2 $\mu$ -HDV载体来自浙江大学<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.3 培养基与生化试剂

本研究所用培养基及普通生化试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 植物培养条件

野生型本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)种植于植物生长箱中, 温度为白天25 $^{\circ}$ C, 夜间18 $^{\circ}$ C, 相对湿度50%和光周期16:8(光照:黑暗)。接种病毒以后, *N. benthamiana*置于温度18 $^{\circ}$ C的植物生长箱, 湿度和光周期不变。马铃薯品种‘大西洋’‘中薯5号’和‘Favorita’组培苗在16 $^{\circ}$ C无菌操作间培养, 组培苗移至土里后在23 $^{\circ}$ C的植物生长箱中, 相对湿度50%和光周期16:8。

### 1.2.2 植物总RNA提取

采用普洛麦格(北京)生物技术有限公司的Easstep<sup>®</sup> Super总RNA提取试剂盒进行, 具体操作根据产品说明书进行。

### 1.2.3 引物设计

从GenBank下载已报道的PMTV全基因组序列, 用Clustal Omega<sup>[12]</sup>进行多序列比对, 根据比对结果在保守位置设计引物(表1)。

### 1.2.4 cDNA合成、PCR扩增与克隆

反转录采用南京诺唯赞生物科技股份有限公司HiScript III 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper), 具体操作根据产品说明书进行。PCR扩增采用50  $\mu$ L体系, 包括25  $\mu$ L的2 $\times$ Phanta高保真DNA聚合酶(用于目的片段扩增)或2 $\times$ Taq Plus Master Mix(用于菌落鉴定), 10 mmol/L上下游引物各1  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L。PCR程序设为95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 30个热循环(95 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火15 s, 72 $^{\circ}$ C延伸时间为: 15 s每1 kb), 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。pCB301-2 $\mu$ -HDV载体的线性化PCR后, 加入1  $\mu$ L Dpn I(NEB北京有限公司), 混匀, 37 $^{\circ}$ C

处理 1 h, 以降解模板质粒。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 回收扩增片段, 回收的片段插入北京全式金(Transgen)生物技术有限公司 pEASY-Blunt Zero 载体, 转化大肠杆菌 *DH5 $\alpha$*  感受态细胞, PCR 鉴定阳性菌落, 用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 FastPure Plasmid Mini Kit 提取质粒, 并送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定, 每个扩增片段最少测序 4 个克隆。

### 1.2.5 序列分析

克隆的 DNA 片段用 Lasergene DNASTAR7.0 软件包(DNASTAR 公司)Seqman Pro7.1.0 进行拼接, 用 Seqbuilder Pro7.1.0 进行 ORF 预测和蛋白翻译。系统进化树采用 MEGA-X 软件中的最大似然法(Maximum-likelihood method), 分支支持率采用 1 000 次重复检测。

### 1.2.6 酵母同源重组

将线性化的 pCB301-2 $\mu$ -HDV 载体与目的片段以等摩尔比混合后, 用北京酷来搏科技有限公司的毕赤酵母感受态制备与转化试剂盒转化酵母。转化产物经低速离心后, 全部涂布于缺色氨酸的 SD 固体培养基, 用 Parafilm 封好口后, 倒置于 30 $^{\circ}$ C 培养 2~4 d。

### 1.2.7 酵母质粒提取

采用北京酷来搏科技有限公司酵母质粒小提试剂盒进行, 具体操作根据产品说明书进行。

### 1.2.8 农杆菌转化与侵染

将 pCB301-PMTV-RNA1、pCB301-PMTV-RNA2 和 pCB301-PMTV-RNA3 通过电击法分别转入农杆菌 GV3101。取 15  $\mu$ L 转化产物, 涂布于含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素(Kanamycin)和 50  $\mu$ g/mL 利福平(Rifampicin)的 LB 固体培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d; 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证。用枪头将含有正确质粒的农杆菌用牙签接种于 3 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和 50  $\mu$ g/mL 利福平的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇床中 120 r/min 过夜培养; 室温下, 9 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。用 1 mL 浸润缓冲液(10 mmol/L MES, pH 5.6; 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮)悬浮菌体, 9 000 r/min 离心 1 min 收集菌

体; 再用 1 mL 浸润缓冲液悬浮与离心一次, 用可见分光光度计将农杆菌稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.5; 取等量含有 pCB301-PMTV-RNA1、pCB301-PMTV-RNA2 和 pCB301-PMTV-RNA3 的农杆菌悬浮混匀后, 用 1 mL 无针头注射器注射接种本氏烟草与马铃薯叶片。

## 2 结果与分析

### 2.1 全基因组克隆与同源性分析

研究所用的马铃薯块茎品种未知, 内部呈现坏死弧纹症状, 经 ELISA 检测为 PMTV 阳性。根据 GenBank 中 PMTV 的序列设计表 1 引物以扩增该 PMTV 分离物的全基因组。经克隆、测序和拼装发现该 PMTV 的 RNA1 全长 6 042 nt, RNA2 全长 3 134 nt, RNA3 全长 2 964 nt(GenBank 序列号为 OP221272-OP221274)。RNA1-3 的编码框与报道完全一致, 但 RNA3 编码的 CRP 前两个密码子分别为 GTG 和 GTG。分析发现, GenBank 中所有 33 条 PMTV 全长 RNA3 仅有 3 个 PMTV 分离物(Sw、Yunnan 和 C52\_P11)编码 CRP 的第二个密码子为 ATG, 而非 GTG, 因此 CRP 可能通过非 ATG 起始翻译。将本 PMTV 的 RNA1、RNA2 和 RNA3 分别与 GenBank 数据库中不同 PMTV 分离物的相应 RNA 片段进行多序列比对, 并分析计算同源性。结果发现, 本 PMTV 的 RNA1 与 RNA2 和中国 Yunnan 分离物的核苷酸同源性最高, 分别为 99.80% 和 99.90%, RNA3 与哥伦比亚的 CO3 核苷酸同源性最高, 为 99.90%(表 2)。

### 2.2 系统进化分析

为明确该 PMTV 分离物与其他 PMTV 分离物的系统进化关系, 从 GenBank 数据库中下载了所有 PMTV RNA1、RNA2 和 RNA3 全长序列(表 1), 并构建了 RNA1、RNA2 以及 RNA3 的最大似然系统进化树。结果发现, PMTV 的 RNA1 可明显分为两个分支, 本 PMTV 分离物的 RNA1 处于第一个分支中, 与 PMTV 云南分离物关系最近(图 1A); RNA2 分为三个分支, 绝大多数分离物处于第一分支, 而分支 III 仅包括秘鲁的 J20\_J203 一个分离物, 本 PMTV 分离物的 RNA2 处于第一个分支中, 与中国 Yunnan、日本 Hiroshima、丹麦 54-8、54-11、54-

21 以及 54-26 聚于同一小分支(图 1B); RNA3 分为四个分支, 分支 III 包括瑞典 Sw 和云南分离物, 而分支 IV 仅包括秘鲁的 J20\_P157 一个分离物, 本 PMTV 分离物的 RNA3 处于第一个分支中, 与丹麦 Rn23 分离物关系最近(图 1C)。

### 2.3 侵染性克隆构建

根据 PMTV RNA1、RNA2 和 RNA3 的 5' 和 3' 最末端非编码区的保守序列, 设计引物以直接扩增 RNA2 和 RNA3 全长序列, RNA1 分为 2 个约 3 000 bp 的片段(分别记为 RNA1-F1 和 RNA1-F2)扩增(图 2A)。用引物 RZ-F 和 CaMV 35S-R, 以 pCB301-2 $\mu$ -HDV 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得线性化的 pCB301-2 $\mu$ -HDV 载体(图 2A)。所有片段两端与载体含有 20 bp 左右的同源臂。将线性化的 pCB301-2 $\mu$ -HDV 载体分别与 RNA2、RNA3、以及 RNA1-F + RNA1-F2 共转化酵母。用引物 35SF 和 RNA1-

5360R 对随机选择的 15 个转化 RNA1-F + RNA1-F2 的酵母克隆进行菌落 PCR 检测, 结果发现有 6 个克隆能扩增到 5 000 bp 大小的目的条带(图 2B), 用引物 RNA2-620F 和 NOS-R 对随机选择的 15 个转化 RNA2 的酵母克隆进行菌落 PCR 检测, 结果表明其中有 5 个克隆能扩增到 2 500 bp 左右的目的条带(图 2C), 用引物 RNA3-800F 和 RNA3-2200R 对随机选择的 15 个转化 RNA3 的酵母克隆进行菌落 PCR 检测, 结果发现有 13 个克隆能扩增到 1 400 bp 左右的目的条带(图 2D)。分别选取 PCR 扩增条带最亮的 3 个克隆, 提取酵母质粒, 直接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。经再次菌落 PCR 验证后, 提取质粒送于公司测序, 获得含有 PMTV 河北省马铃薯分离物 RNA1、RNA2 和 RNA3 的质粒, 并命名为 pCB301-PMTV-RNA1、pCB301-PMTV-RNA2 和 pCB301-PMTV-RNA3。

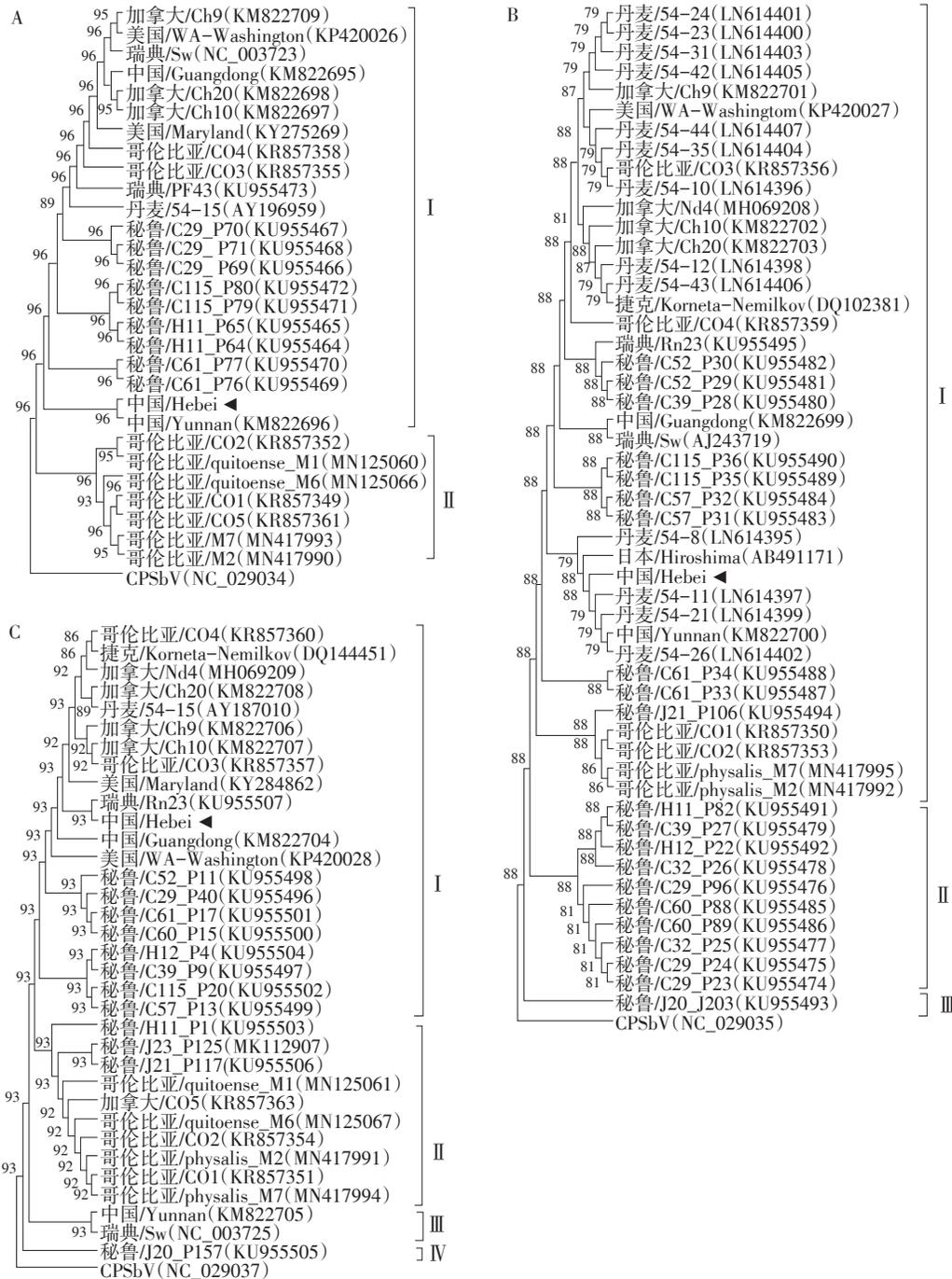
表 1 试验所用引物序列  
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Prime name	序列(5'~3') Sequence (5'-3')	用途 Usage	
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	大肠杆菌菌落 PCR	
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC		
35S-RNA1-F	<u>CTTCATTTTCATTTGGAGAGGGTATTTTTATCAACTCTAACTAGCCAAGTGCTTAA</u>	侵染性克隆构建与酵母菌落 PCR	
RNA1-3100R	CTTTGCACCCCTCTTCTTAAATGCC		
RNA1-3000F	GGTGAAATGTCATCGGACAAC		
35S-RNA2-F	<u>CTTCATTTTCATTTGGAGAGGGTATTTTTTAAGTCTAAACAGTTTGTGACTAAC</u>		
35S-RNA3-F	<u>CTTCATTTTCATTTGGAGAGGGTATTTCAACTCTACCTAGCCGAGTGCTTAC</u>		
RZ-F	GGGTCGGCATGGCATCTCCACCTC		
CaMV35S-R	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC		
PMTV-RZ-R	<u>TGGAGATGCCATGCCGACCCGTGGTCTTGGATACCCCTCCAAGG</u>		
35SF	CTATCCTTCGCAAGACCCCTTC		
NOS-R	TTGCCAAATGTTTGAACGATC		
RNA1-730F	AGGATTGTGTATACGATCAGAGC		RT-PCR 检测
RNA1-5360R	CTCCGGATCCTTATAAGTTGCTT		
RNA2-620F	ATATAATTGTAGCGTTGCAGACA		
RNA2-2800R	CGTGTGACGGGTTTACCT		
RNA3-800F	TGTTGAAAGTGGATTCAAATCTA		
RNA3-2200R	TGAAGCTTCTGATATGACTTACT		
RNA2-1230F	ACCTGAACGACTGGTTGT		

注: 下划线部分为载体 pCB301-2 $\mu$ -HDV 序列。  
Note: The underlined part is the vector pCB301-2 $\mu$ -HDV sequence.

表2 河北分离物与其他分离物核苷酸序列同源性  
Table 2 Nucleotide sequence identities between Hebei and other PMTV isolates

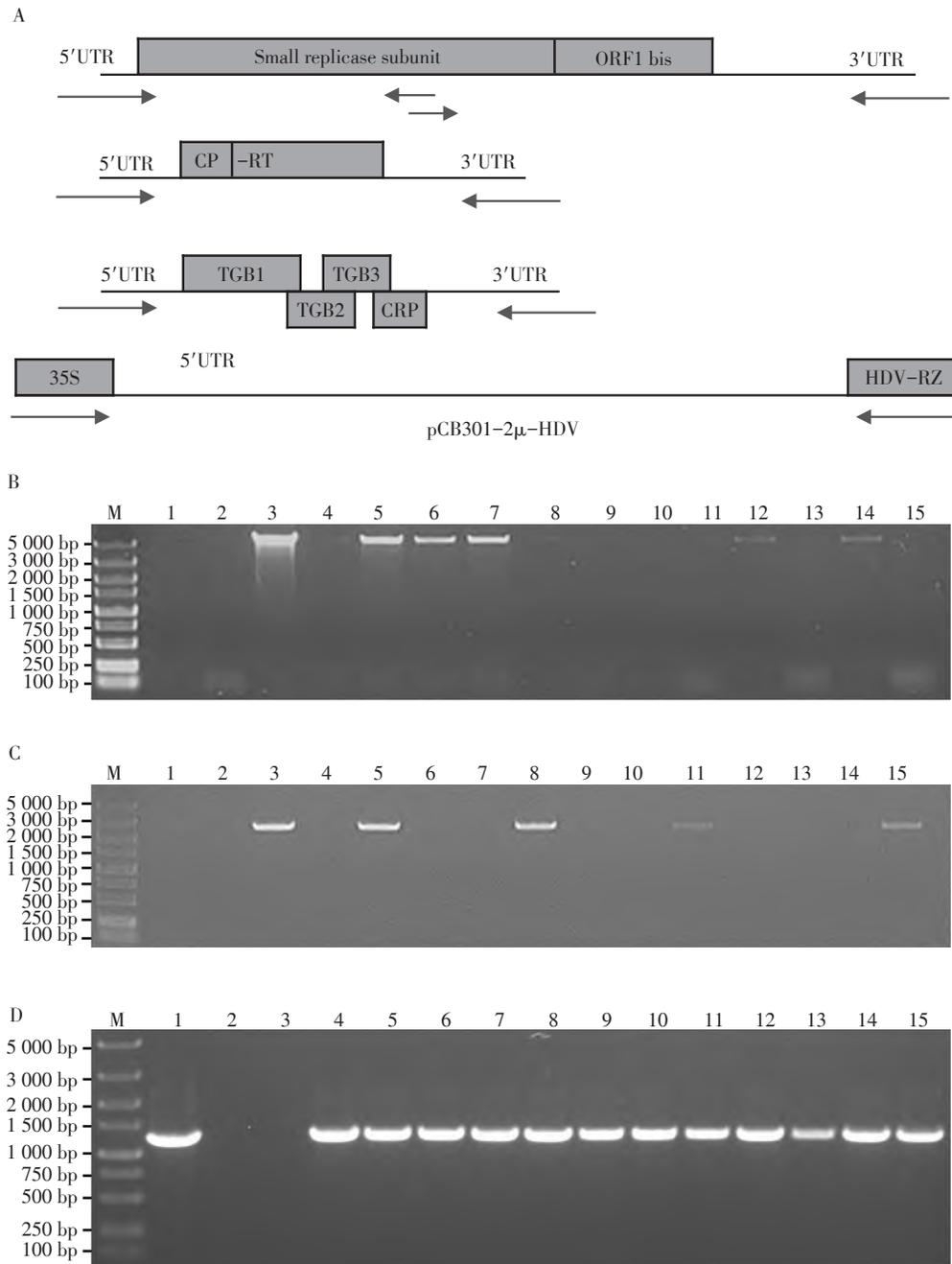
序号 No.	分离物名称 Isolate name	来源 Origin	RNA1	RNA2	RNA3	序号 No.	分离物名称 Isolate name	来源 Origin	RNA1	RNA2	RNA3
1	Guangdong	中国	98.46	98.88	99.80	40	C57_P32	秘鲁	-	98.98	-
2	Ch20	加拿大	97.88	98.95	98.89	41	C57_P31	秘鲁	-	98.92	-
3	Ch10	加拿大	98.49	98.85	98.72	42	C52_P30	秘鲁	-	98.92	-
4	Ch9	加拿大	97.85	98.97	98.99	43	C52_P29	秘鲁	-	98.82	-
5	Yunnan	中国	<b>99.80</b>	<b>99.90</b>	97.60	44	C39_P28	秘鲁	-	98.85	-
6	CO1	哥伦比亚	97.12	97.64	97.98	45	C39_P27	秘鲁	-	97.86	-
7	CO2	哥伦比亚	97.40	97.67	98.28	46	C32_P26	秘鲁	-	97.80	-
8	CO3	哥伦比亚	98.54	98.95	<b>99.90</b>	47	C32_P25	秘鲁	-	90.71	-
9	CO4	哥伦比亚	98.54	99.01	99.83	48	C29_P96	秘鲁	-	97.70	-
10	CO5	哥伦比亚	97.24	97.61	97.91	49	C29_P24	秘鲁	-	90.71	-
11	Sw	瑞典	98.31	98.76	97.60	50	C29_P23	秘鲁	-	90.71	-
12	Maryland	美国	98.54	98.94	99.39	51	54-35	丹麦	-	88.51	-
13	WA-Washington	美国	98.41	98.82	99.66	52	54-31	丹麦	-	88.45	-
14	54-15	丹麦	91.10	82.35	96.12	53	54-26	丹麦	-	89.28	-
15	Physalis_M7	哥伦比亚	96.43	95.72	97.57	54	54-24	丹麦	-	88.45	-
16	Physalis_M2	哥伦比亚	96.94	96.20	97.40	55	54-23	丹麦	-	88.39	-
17	quitoense_M6	哥伦比亚	93.64	-	97.20	56	54-21	丹麦	-	89.37	-
18	quitoense_M1	哥伦比亚	96.52	-	97.20	57	54-12	丹麦	-	88.48	-
19	PF43	瑞典	98.59	-	-	58	54-11	丹麦	-	89.41	-
20	C115_P80	秘鲁	98.71	-	-	59	54-10	丹麦	-	88.51	-
21	C115_P79	秘鲁	98.74	-	-	60	54-8	丹麦	-	89.06	-
22	C61_P77	秘鲁	98.71	-	-	61	Hiroshima	日本	-	99.94	-
23	C61_P76	秘鲁	98.69	-	-	62	54-44	丹麦	-	88.51	-
24	C29_P71	秘鲁	98.68	-	-	63	54-43	丹麦	-	88.48	-
25	C29_P70	秘鲁	98.66	-	-	64	54-42	丹麦	-	88.51	-
26	C29_P69	秘鲁	98.64	-	-	65	Korneta-Nemilkov	捷克	-	97.51	-
27	H11_P65	秘鲁	98.66	-	-	66	Nd4	加拿大	-	91.29	92.85
28	H11_P64	秘鲁	98.66	-	-	67	J23_P125	秘鲁	-	-	99.02
29	Rn23	瑞典	-	98.92	99.87	68	J21_P117	秘鲁	-	-	99.02
30	J21_P106	秘鲁	-	97.61	-	69	J20_P157	秘鲁	-	-	94.60
31	J20_J203	秘鲁	-	73.87	-	70	H12_P4	秘鲁	-	-	99.26
32	H12_P22	秘鲁	-	97.86	-	71	H11_P1	秘鲁	-	-	98.79
33	H11_P82	秘鲁	-	97.86	-	72	C115_P20	秘鲁	-	-	99.49
34	C115_P36	秘鲁	-	98.79	-	73	C61_P17	秘鲁	-	-	99.16
35	C115_P35	秘鲁	-	98.66	-	74	C60_P15	秘鲁	-	-	99.22
36	C61_P34	秘鲁	-	98.50	-	75	C57_P13	秘鲁	-	-	99.43
37	C61_P33	秘鲁	-	98.53	-	76	C52_P11	秘鲁	-	-	99.09
38	C60_P89	秘鲁	-	90.68	-	77	C39_P9	秘鲁	-	-	99.22
39	C60_P88	秘鲁	-	90.62	-	78	C29_P40	秘鲁	-	-	99.19



注: A~C. PMTV RNA1、RNA2、RNA3的全长核苷酸序列构建最大似然系统进化树。分支上的数字表示1 000次自展重复的百分支持率。黑色箭头表示PMTV河北分离物的位置。进化树的根与哥伦比亚马铃薯土传病毒同为马铃薯帚顶病毒属。

Note: A~C. Maximum likelihood phylogenetic trees are constructed with full-length nucleotide sequences of PMTV RNA1, RNA2, and RNA3, respectively. The numbers on branches indicate percentage support values of 1 000 bootstrap replicates. The position of PMTV Hebei isolate is indicated by a black arrowhead. Trees are rooted with Colombian potato soil-borne virus (CPSbV) of the genus *Pomovirus*.

图1 PMTV最大似然系统进化树  
Figure 1 Maximum likelihood phylogenetic trees of PMTV



注: A. 酵母同源重组构建PMTV全长策略示意图。载体中PMTV的ORF、CaMV的35S启动子、丁型肝炎病毒的核酶被标记,引物用箭头表示,所有片段均按比例绘制。B-D. PCR分别筛选具有完整长度的RNA1、RNA2、RNA3。M. 5 000 bp Marker, 1~15代表15个菌落。

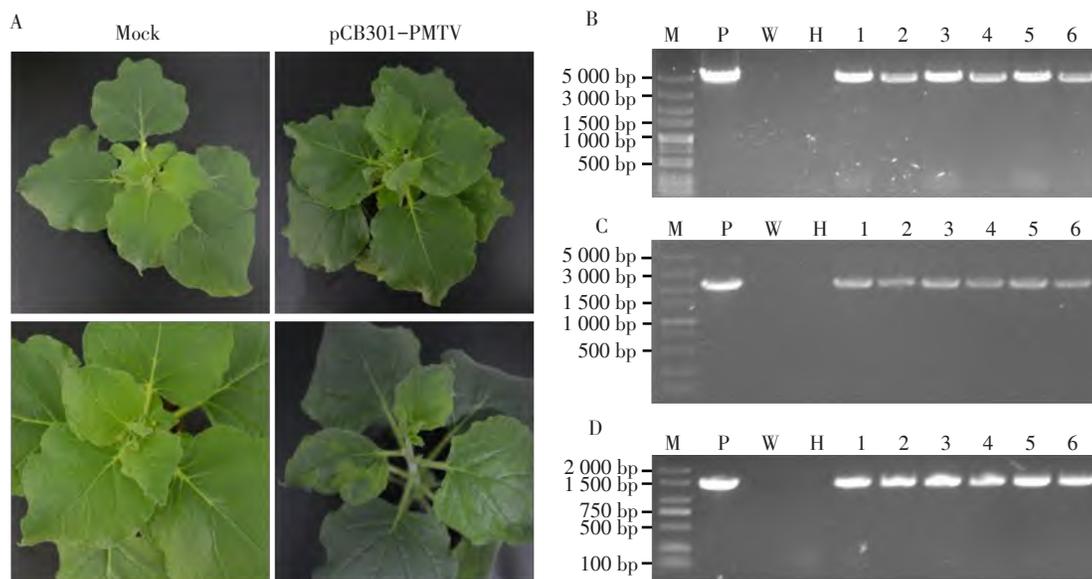
Note: A. Schematic illustration of the cloning strategy for yeast homologous recombination-mediated assembly of the PMTV full-length clones. ORFs of PMTV, the Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, and Hepatitis delta virus (HDV) ribozyme (HDV-RZ) of pCB301-2 $\mu$ -HDV are labeled. Primers are indicated by lines with arrows, and all of the fragments are drawn to scale. B-D. PCR screens colonies with full-length RNA1, RNA2, and RNA3, respectively. M. 5 000 bp Marker; Lanes 1-15 showing PCR results of fifteen independent colonies.

图2 PMTV 侵染性cDNA克隆的构建  
Figure 2 Construction of PMTV infectious cDNA clone

## 2.4 PMTV 侵染性克隆在本氏烟上的侵染性测定

用本氏烟验证所构建PMTV侵染性克隆的活性。将含有 pCB301-PMTV-RNA1、pCB301-PMTV-RNA2 和 pCB301-PMTV-RNA3 的农杆菌菌液等比例混合后, 注射6株4周大小的本氏烟。接种后9 d时, 本氏烟的系统叶片开始出现褪绿症状, 随着时间的延长, 症状逐渐加重, 并出现明显的花叶和叶片轻微皱缩的症状(图3A)。在接

种14 d, 采集本氏烟带有症状的叶片, 提取总RNA, 分别用引物 RNA1-730F+RNA1-5360R、RNA2-620F+RNA2-2800R、RNA3-800F+RNA3-2200R 进行 RT-PCR, 以检测 RNA1、RNA2 和 RNA3。RT-PCR 结果显示, 在6株本氏烟叶片中均可以检测到病毒 RNA1、RNA2 和 RNA3 的存在(图3B~D), 表明 PMTV 的侵染效率达到100%(图3B~D)。



注: A. PMTV 侵染性 cDNA 克隆通过农杆菌注射烟草幼苗 14 d 的症状; B-D. RT-PCR 分别检测烟草系统叶 RNA1、RNA2、RNA3。M、P、W、H 分别表示 DNA 标准分子量、质粒、水、对照。1~6 分别代表 6 株接种 PMTV 侵染性 cDNA 克隆的烟草。

Note: A. Symptoms of *Nicotiana benthamiana* seedlings that were agroinfiltrated with PMTV infectious cDNA clone at 14 days post-inoculation (dpi); B-D. RT-PCR analysis for the presence of RNA1, RNA2, and RNA3 on upper systemic leaves, respectively. Lanes M, P, W, and H represent DNA ladder, plasmid, water, and mock-inoculation controls, respectively. Lanes 1-6 represents six independent plants that were inoculated with PMTV infectious cDNA clone.

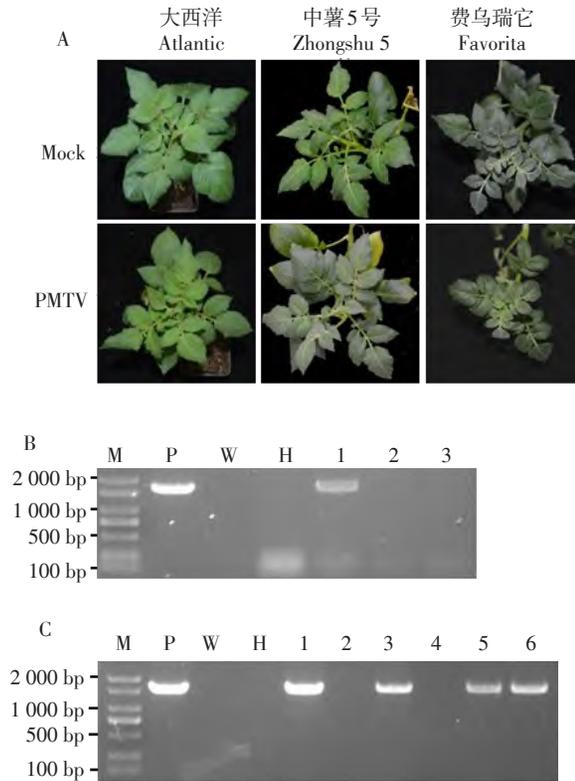
图3 PMTV 侵染性 cDNA 克隆在本氏烟上的侵染性测定

Figure 3 Infectivity analysis of PMTV infectious cDNA clone on *N. benthamiana*

## 2.5 PMTV 侵染性克隆在马铃薯上的侵染性测定

将含有 pCB301-PMTV-RNA1、pCB301-PMTV-RNA2 和 pCB301-PMTV-RNA3 的农杆菌菌液等比例混合后, 分别注射‘大西洋’‘中薯5号’和‘Favorita’无毒组培苗(每个品种各6株), 以进一步检测 PMTV 侵染性克隆对马铃薯的侵染能力。接种20 d后, ‘大西洋’叶片出现轻微的黄化, 而‘费乌瑞它’和‘中薯5号’没有明显症状(图4A)。接种20 d时, 采集组培苗上部带有症状的叶片, 提取6株

混合样的总 RNA, 用引物 RNA2-1230F 与 RNA2-2800R 进行 RT-PCR 检测, 结果发现‘大西洋’中可以扩增到 PMTV RNA2 的目的片段, 而‘费乌瑞它’和‘中薯5号’中不能扩增到预期大小的目的片段(图4B)。分别提取接种 PMTV 的6株‘大西洋’总 RNA, 用引物 RNA2-1230F 与 RNA2-2800R 进行 RT-PCR 检测, 以分析 PMTV 的侵染效率。结果发现4株‘大西洋’可以检测到病毒的存在, 发病率为66.67%(图4C)。



注: A. PMTV 侵染性 cDNA 克隆通过农杆菌注射马铃薯幼苗 20 d 的症状。B. RT-PCR 检测马铃薯系统叶 PMTV RNA2。M、P、W、H 分别表示 DNA 标准分子量、质粒、水、对照; 1~3 分别代表马铃薯品种‘大西洋’‘中薯 5 号’‘费乌瑞它’。C. RT-PCR 检测 6 株马铃薯品种‘大西洋’的 PMTV RNA2。1~6 分别代表 6 株接种 PMTV 侵染性 cDNA 克隆的马铃薯‘大西洋’。

Note: A. Symptoms of potato seedlings that were agroinfiltrated with PMTV infectious cDNA clone at 20 days. B. RT-PCR analysis for the presence of PMTV RNA2 on upper potato leaves. Lanes M, P, W, and H represent DNA ladder, plasmid, water, and mock-inoculation controls, respectively; lanes 1-3 represent potato cultivars 'Atlantic', 'Zhongshu 5', and 'Favorita', respectively. C. RT-PCR detection for the presence of PMTV RNA2 on the six seedlings of potato cultivar 'Atlantic'. Lanes 1 to 6 represent six seedlings of potato cultivar 'Atlantic' inoculated with PMTV infectious cDNA clone.

图4 PMTV 侵染性 cDNA 克隆在马铃薯上的侵染性测定

Figure 4 Infectivity analysis of PMTV infectious cDNA clone on potato

### 3 讨论

本研究从一个采自河北省张北县的马铃薯薯块上克隆了一株 PMTV 的全基因组序列, 多序列比对和系统进化树分析表明, PMTV 的 RNA1 与此前报道一致分为两个分支<sup>[13,14]</sup>, RNA2 分为 3 个分支, 该分离物的 RNA1 与 RNA2 均与国内报道的云南分离物关系最近, 说明本研究所用马铃薯上的 PMTV 有可能通过云南与河北之间的种薯调运而来, 但还需进一步研究确定。值得注意的是, 系统进化分析发现该分离物的 RNA3 与来自瑞典的 Rn23 关

系最近而与云南马铃薯分离物的进化关系较远, 说明本试验克隆的 PMTV 的 RNA3 曾与其他分离物的 RNA3 发生过重配, 但是重配发生的时间及地点未知。

PMTV 侵染性克隆之前已有报道<sup>[15]</sup>。本试验构建的 PMTV 侵染性克隆与之相比, 具有不需要依赖于体外转录的优点。此外, 本侵染性克隆来自于中国本土发生的带病马铃薯, 而不是 PMTV 代表株系 Sw。侵染性试验表明本分离在本氏烟上造成花叶的症状, 而 Sw 造成黄花叶的症状<sup>[15]</sup>, 说明两者在致病性方面存在明显差异。马铃薯侵染试验表

明, 在本试验的条件下, 该侵染性克隆能侵染‘大西洋’, 但不能引起明显的症状, 也不能侵染‘中薯5号’与‘费乌瑞它’, 说明本侵染性克隆在不同的马铃薯品种上侵染力不同。温度在PMTV致病过程中具有重要的作用, 低温有利于病症的发展和显现<sup>[16]</sup>。本研究未能在‘大西洋’上观察到症状, 可能是由于温度等条件所限。而不能侵染‘中薯5号’与‘费乌瑞它’的原因未知, 还需进一步试验验证。

PMTV为三分体病毒, 成功侵染需要3条RNA在同一细胞表达。本试验所构建的侵染性克隆虽然在本氏烟上实现100%的侵染效率, 但侵染‘大西洋’时只有66.67%(4/6)的侵染率, 后续可考虑将病毒的两条RNA整合到一个质粒中, 以提高马铃薯的侵染效率。本试验构建的侵染性克隆成功在烟草与马铃薯建立侵染, 为进一步开展PMTV与寄主互作研究, 揭示其分子致病机制奠定基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 王丽玮, 万中义, 宋亚迪, 等. 生防链霉菌PBSH9对马铃薯疮痂病菌的抑制作用及其代谢物培养条件优化[J]. 中国蔬菜, 2022(6): 64-71.
- [ 2 ] Loebenstein G, Berger P H, Brunt A, *et al.* Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes [M]. Dordrecht: Kluwer, 2001.
- [ 3 ] Adams M J, Adkins S, Bragard C, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Virgaviridae [J]. Journal of General Virology, 2017, 98(8): 1999-2000.
- [ 4 ] 于倩倩, 白艳菊, 牛若超, 等. 马铃薯帚顶病毒研究进展与风险分析[J]. 现代化农业, 2021(8): 25-27.
- [ 5 ] 雷艳, 汤琳菲, 王欢妍, 等. 马铃薯帚顶病毒研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(3): 10-14.
- [ 6 ] Hu X, Lei Y, Xiong X, *et al.* Identification of potato mop-top virus (PMTV) in potatoes in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2013, 35(3): 402-406.
- [ 7 ] Hu X, Dickison V, Lei Y, *et al.* Molecular characterization of potato mop-top virus isolates from China and Canada and development of RT-PCR differentiation of two sequence variant groups [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2016, 38(2): 234-242.
- [ 8 ] 杨雯, 何成勇, 姜继红, 等. 我国马铃薯帚顶病毒的分子检测[J]. 植物保护学报, 2019, 46(6): 1371-1372.
- [ 9 ] Savenkov E I, Sandgren M, Valkonen J P T. Complete sequence of RNA 1 and the presence of tRNA-like structures in all RNAs of potato mop-top virus, genus *Pomovirus* [J]. Journal of General Virology, 1999, 80(10): 2779-2784.
- [ 10 ] Likhovitskaya N I, Yelina N E, Zamyatnin A A, *et al.* Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of potato mop-top virus [J]. Journal of General Virology, 2005, 86(10): 2879-2889.
- [ 11 ] Sun K, Zhao D, Liu Y, *et al.* Rapid construction of complex plant RNA virus infectious cDNA clones for agroinfection using a yeast-*E. coli*-*Agrobacterium* shuttle vector [J]. Viruses, 2017, 9(11): 332-346.
- [ 12 ] Sievers F, Higgins D G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences [J]. Protein Science, 2018, 27(1): 135-145.
- [ 13 ] Kalyandurg P, Gil J F, Likhovitskaya N I, *et al.* Molecular and pathological characterization of 61 potato mop-top virus full-length cDNAs reveals great variability of the virus in the centre of potato domestication, novel genotypes and evidence for recombination [J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(6): 864-877.
- [ 14 ] Gil J F, Adams I, Boonham N, *et al.* Molecular and biological characterization of potato mop-top virus (PMTV, *Pomovirus*) isolates from the potato-growing regions of Colombia [J]. Plant Pathology, 2016, 65(7): 1210-1220.
- [ 15 ] Savenkov E I, Germundsson A, Zamyatnin A A, *et al.* Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana* [J]. Journal of General Virology, 2003, 84(4): 1001-1005.
- [ 16 ] Carnegie S F, Davey T, Saddler G S. Effect of temperature on the transmission of potato mop-top virus from seed tuber and by its vector, *Spongospora subterranea* [J]. Plant Pathology, 2010, 59(1): 22-30.