

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2015)01-0037-05

武汉地区马铃薯Y病毒株系的类型

陈汝豪^{1,2,3,4}, 王靖惠^{1,2,3,4}, 姚妮娜^{1,2,3,4}, 柳俊^{1,2,3,4}, NIE Xianzhou⁵, 聂碧华^{1,2,3,4*}

(1. 园艺植物生物学教育部重点实验室; 2. 国家蔬菜改良中心华中分中心; 3. 湖北省马铃薯工程技术研究中心; 4. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070; 5. 加拿大农业与农业食品部马铃薯研究中心, 加拿大新不伦瑞克, 弗雷德里克顿 E3B4Z7)

摘要: 马铃薯Y病毒(PVY)是严重危害我国马铃薯生产的主要病毒之一。本研究通过RT-PCR的方法, 对依据症状采集的124份马铃薯叶片样品进行了病毒检测, 并对其中PVY阳性样品进行了株系类型分析。结果显示, 在93份PVY阳性样品中, PVY^{NTN/NO}类型株系占60.2%, 而PVY^O普通株系占20.4%, 还有18个样品(19.4%)显示受到两种类型PVY的混合侵染。进一步分析表明, 在PVY^{NTN/NO}类型株系中, PVY^{NTN}、PVY^{NO}和PVY^N三种株系分别占83.8%、12.2%和4.0%; 而PVY^O普通株系中, PVY^{O-FL}和PVY^{O-RB}两种变异型各占70.3%和29.7%。本研究结果显示, PVY^{NTN}和PVY^{O-FL}是检测样品中主要的PVY株系, 该结果为指导马铃薯PVY的防治提供一定的依据。

关键词: 马铃薯; 马铃薯Y病毒; 多样性; RT-PCR

Potato Virus Y (PVY) Strain Status in Potato Samples Collected from Wuhan Area

CHEN Ruhao^{1,2,3,4}, WANG Jinghui^{1,2,3,4}, YAO Nina^{1,2,3,4}, LIU Jun^{1,2,3,4}, NIE Xianzhou⁵, NIE Bihua^{1,2,3,4*}

(1. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education; 2. National Center for Vegetable Improvement (Central China); 3. Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province; 4. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 5. Potato Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 850 Lincoln Road, P. O. Box 20280, Fredericton NBE3B4Z7, Canada)

Abstract: Potato virus Y (PVY) is one of the main viruses which restricts potato production in China. In this study, 124 leaf samples were collected in potato field according to the foliar symptoms. RNAs were extracted and RT-PCR methods were used for the strain analysis of those PVY positive samples. The results showed that 60.2% PVY^{NTN/NO} and 20.4% PVY^O were detected in 93 PVY positive samples, while 18 samples (19.4%) were infected by both. Furthermore, 83.8% PVY^{NTN}, 12.2% PVY^{NO} and 4.0% PVY^N were detected among PVY^{NTN/NO} group samples, respectively. Meanwhile, PVY^O group samples were consisted of 70.3% PVY^{O-FL} and 29.7% PVY^{O-RB}, respectively. The investigation revealed that PVY^{NTN} and PVY^{O-FL} were the epidemic PVY strains/isolates in samples collected in this study, which might provide important and useful information for PVY control.

Key Words: potato; potato virus Y; diversity; reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

马铃薯是仅次于水稻、小麦和玉米的世界第四大粮食作物, 在全世界耕地面积减少和谷物类增产幅度下降的形势下, 作为最大的块茎作物, 马铃薯成为未来发展中国家粮食安全的重要

收稿日期: 2014-11-06

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-10-P08); 国家自然科学基金项目(31101191); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2011QC080)。

作者简介: 陈汝豪(1990-), 男, 硕士研究生, 从事马铃薯病毒互作研究。

*通信作者(Corresponding author): 聂碧华, 副教授, 博士, 主要从事马铃薯病毒互作研究, E-mail: nbihua@mail.hzau.edu.cn。

保障^[1,2]。马铃薯是无性繁殖作物, 病毒病尤其严重, 也是导致马铃薯种薯退化的主要原因^[3]。据报道, 有近40种病毒和2种类病毒能侵染马铃薯, 其中9种病毒和1种类病毒被认为分布广泛且危害严重, 其中马铃薯Y病毒(PVY)造成的产量损失可达80%^[4,5]。

PVY有丰富的株系多样性, 包括普通株系(PVY⁰), 烟草叶脉坏死株系(PVY^N), 重组株系(PVY^{N:0}和PVY^{NTN})等^[6,7]。近些年, PVY^{NTN}在世界许多国家和地区相继出现, 由于它能导致块茎发生环状坏死而受到广泛关注^[6,8]。而PVY⁰的一种致病性更强的变异型PVY⁰-FL也超过原有的PVY⁰成为加拿大东部地区主要PVY⁰类型^[9]。表明PVY的株系组成不仅复杂, 而且在发生变化。

常规的ELISA病毒检测通常不能区分PVY的各个株系, 因此国内鲜有PVY株系分析的报道。本研究对武汉地区马铃薯田间收集的PVY样品进行了基因型分析, 初步了解了PVY的株系类型的组成, 对PVY的防治和新品种选育都有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 样品收集和总RNA的提取

2012年春季, 在武汉市华中农业大学马铃薯田间依据PVY引起的植株花叶、失绿和坏死等常见症状, 采集了124份叶片样品, 并用Na₂SO₃法提取总RNA^[10], 具体步骤如下: 用叶汁提取仪榨取6

滴叶片汁液加入300 μL抽提缓冲液(含0.1M Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.65%的Na₂SO₃, 20 μL/mL的DNase I), 在37℃水浴中孵育10 min。加入200 μL水饱和酚充分摇匀, 在4℃、12 000 r/min离心15 min(下同)。取上清液加入400 μl苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 充分摇匀后离心。收集上清液加入50 μL 3 M醋酸钠和500 μl异丙醇, 震荡摇匀, -70℃放置40 min, 离心倾去上清液。用70%的乙醇洗涤沉淀, 干燥后用无菌水溶解RNA沉淀, 于-20℃存储。

1.2 PVY病毒的RT-PCR检测

反转录反应(RT)用2.5 μL RNA(400 ng)在68℃孵育8 min, 在冰上冷却3 min使RNA变性。加入7.5 μL RT反应混合液, 使最终各组分浓度达到要求(20 ng/μL 6-9 bp 随机引物, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM 4种dNTPs, 20 U RNasin以及200 U MMLV-RT), 然后在42℃孵育60 min, 最后95℃ 3 min终止反应。

PVY以及COX1基因(BA000042)检测的PCR反应用2 μL的样品cDNA模板在25 μL体系中进行(含1×PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0.625 U Taq, 4 mM 每种dNTPs, 1 μM各引物)。PCR反应: 94.0℃变性1.5 min, 接着94.0℃变性45 s; 57℃退火45 s; 72℃延伸1 min; 36个循环, 最后72℃延伸10 min。8 μL PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测并拍照。PVY及COX1基因检测引物分别产生480 bp和500 bp的特征条带^[11]。所用引物见表1。

表1 马铃薯PVY病毒检测和分型的PCR引物

Table 1 Primers for PCR detection and differentiation for potato virus Y

编号 Number	株系类型 Strain/isolate	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	产物 (bp) Product
1	PVY	5'-ACGTCCAAAATGAGAATGCC-3'	5'-TGGTGTTTCGTGATGTGACCT-3'	480
2	COX	5'-CTAATTCTGGGCTAGACATTGC-3'	5'-CTTCACATAGCTTTTCGGTCTCC-3'	500
3	PVY all	5'-AAGCTTCCATACTCACCCGC-3'	5'-CATTTGTGCCCAATTGCC-3'	856
4	PVY ^{N/NTN/0}	5'-GGTGAAGCTAATCATGTCAAC-3'	5'-CATTTGTGCCCAATTGCC-3'	443
5	PVY ⁰	5'-GACAGTTGGACTTTTGCAACG-3'	5'-CATTTGTGCCCAATTGCC-3'	281
6	PVY RJ1	5'-CATGATGGATCTGGCTACA-3'	5'-AGTGGGTACGTTAGATGTAGG-3'	641
7	PVY RJ2	5'-GATCTCAAGTTGAAGGGGAC-3'	5'-TTGCGGACATCACTAAAGCG-3'	448
8	PVY RJ3	5'-CGTAATCTGCGCGATGGAA-3'	5'-GCCACTGCATATGTAAATACT-3'	290
9	PVY ⁰ -FL	5'-AAGCAGCAAGAAAGATGCAAG-3'	5'-AGAAATGTGCCATGATTTGCCT-3'	464
10	PVY ⁰ -RB	5'-ATAAAGATGTGAATGCCGGCA-3v	5'-AGAAATGTGCCATGATTTGCCT-3'	399
11	PVY ⁰ all	5'-GCAACTCAATCACAGTTGA-3'	5'-AGAAATGTGCCATGATTTGCCT-3'	238

1.3 PVY株系类型分析

PVY阳性样品的株系类型分析分为三步: 1) P1基因分析^[12], 用一个三重PCR区分PVY⁰与PVY^{N/N:0/NTN}类型, 其中856 bp为共有带型, 443 bp为PVY^{N/N:0/NTN}类型的特征带, 281 bp为PVY⁰特征带; 2)重组位点检测^[6], 以区分PVY^N、PVY^{N:0}和PVY^{NTN}三种株系, 其中PVY^N株系没有重组位点, PVY^{N:0}株系含有641 bp的重组位点1(RJ1), 而PVY^{NTN}株系含有所有三个重组位点(RJ1、RJ2和RJ3); 3)三重RT-PCR分析鉴定PVY⁰的强毒(PVY⁰-FL)和弱毒(PVY⁰-RB)变异型^[9], 其中464 bp为强毒PVY⁰-FL类型的特征带, 399 bp为弱毒PVY⁰-RB类型的特征带, 238 bp为两种PVY⁰类型的共有条带。上述RT-PCR反应引物见表1。

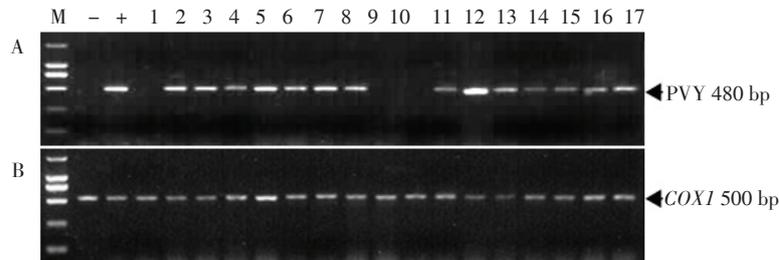
2 结果与分析

2.1 PVY病毒的RT-PCR检测

对样品PVY以及内参基因COX1的检测结果如图1所示。124个样品中93个样品中检出PVY 480 bp的特征带, 占总数的75.0%(图1A), 内参基因500 bp的特征条带均十分明显(图1B)。由此可见, 根据植株叶片症状来采集PVY病毒样品的方法是高效、可行的。

2.2 PVY病毒株系类型分析

对上述93个PVY阳性样品进行进一步基因型的分析以调查PVY的株系组成。首先进行P1基因分析。如图2A所示, 所有PVY阳性样品均扩增出856 bp的共有条带, 而其中56个样品仅扩增出



A: PVY的RT-PCR检测; B: 马铃薯内参基因COX1的RT-PCR检测; 泳道1~17: 田间采集马铃薯样品; ‘-’: 健康植株; ‘+’: PVY阳性对照; M: 分子量标记, 从上到下依次为2000, 1000, 750, 500, 250和100 bp。

A: PVY detection by RT-PCR assay; B: COX1 gene detection by RT-PCR assay; Lanes 1~17: RNA samples of potato leaves; ‘-’: healthy potato leaf sample; ‘+’: PVY positive control; M: DNA ladder (from top to bottom: 2000, 1000, 750, 500, 250, and 100 bp).

图1 RT-PCR检测马铃薯田间样品的PVY和内参基因COX1

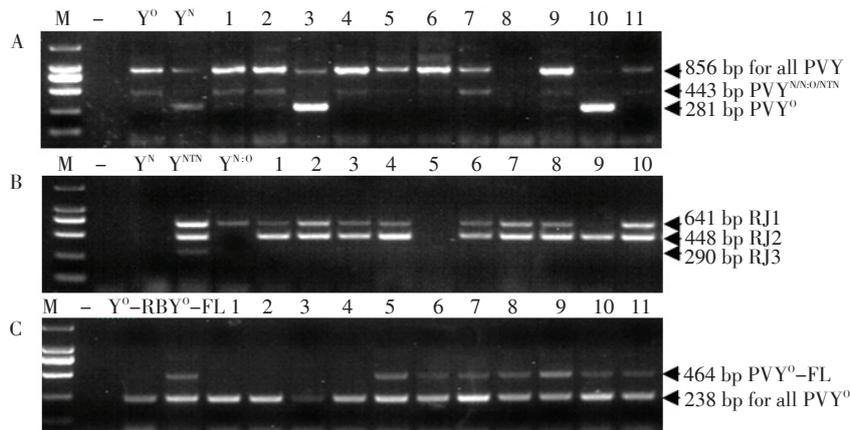
Figure 1 RT-PCR assay for detection of PVY and COX1 gene in RNA samples of field collected potato leaves

443 bp特征带, 其P1基因为PVY^{N/NTN:0}类型, 占60.2%; 19个样品只扩增出281 bp的特征带, 其P1基因为PVY⁰类型, 占20.4%; 还有18个样品具有443 bp和281 bp两条特征带, 推断为上述两种类型PVY的混合侵染, 占19.4%。

继续对74个PVY^{N/N:0/NTN}类型PVY样品进行重组位点分析, 部分样品电泳结果如图2B所示。3个样品没有扩增出任何特征带, 推断它们是没有重组位点的PVY^N, 占总数的4.0%; 有9个样品扩增出一条641 bp的特征条带, 推断它们是具有一个重组位点的PVY^{N:0}, 占12.2%。其余62样品扩增出了RJ1

(641 bp)和RJ2(448 bp)两个重组位点, 比阳性材料PVY^{NTN}少了一个RJ3(290 bp)重组位点, 推断它们可能是PVY^{NTN}, 占83.8%。

对另外37个PVY⁰类型样品进行了CP基因分析以区分它们可能的致病力强弱, 部分样品电泳结果如图2C所示。所有样品都含有238 bp的PVY⁰共有的条带, 其中有26个样品具有464 bp特征带, 属于强毒的PVY⁰-FL变异型, 占PVY⁰总数的70.3%。其余样品与阳性对照PVY⁰-RB一样, 只有一条238 bp的共有条带, 虽然缺少299 bp的特征带, 推断为弱毒的PVY⁰-RB变异型, 占PVY⁰总数的29.7%。



A: P1 基因的三重 RT-PCR 分析区分 PVY⁰ 与 PVY^{YN/0/NTN}; B: 重组位点的三重 RT-PCR 检测, 以区分 PVY^N、PVY^{N:0} 和 PVY^{NTN} 三种株系; C: CP 基因的三重 RT-PCR 分析鉴定 PVY⁰ 的强毒(PVY⁰-FL)和弱毒(PVY⁰-RB)类型。‘-’: 健康植株; ‘Y⁰, Y^N, Y^{NTN}, Y^{N:0}, Y⁰-RB 和 Y⁰-FL’: 各种 PVY 株系分离物阳性对照; M: 分子量标记, 从上到下依次为 2000, 1000, 750, 500, 250 和 100 bp。

A: P1 gene-based triplex RT-PCR assay for discrimination of PVY⁰ from PVY^{YN/0/NTN}; B: Recombinant joint (RJ)-based triplex RT-PCR assay for discrimination of PVY^N, PVY^{N:0} and PVY^{NTN}; C: CP gene-based triplex RT-PCR assay for discrimination of PVY⁰-FL and PVY⁰-RB isolates of PVY⁰. ‘-’: healthy potato leaf sample; ‘Y⁰, Y^N, Y^{NTN}, Y^{N:0}, Y⁰-RB and Y⁰-FL’: positive control of various PVY isolates; M: DNA ladder (from top to bottom: 2000, 1000, 750, 500, 250 and 100 bp).

图2 PVY 阳性样品的基因型分析

Figure 2 RT-PCR based genotyping assay of PVY positive samples

3 讨论

本研究用 RT-PCR 的方法对依据症状采集的马铃薯叶片样品进行了 PVY 检测。结果显示, 根据 PVY 在马铃薯上引起的花叶、失绿和坏死等常见症状来进行取样, 获得 PVY 阳性样品的比率可达 75.0%。而那些 PVY 检测为阴性又表现出疑似症状的样品, 可能由其它病毒或其它原因导致。

通过对这些 PVY 阳性样品的 P1 基因、重组位点以及 CP 基因的 RT-PCR 分析, 进一步明确了这些 PVY 样品的株系类型。包含混合侵染, 本研究在 93 份 PVY 阳性样品中共检测出 111 份阳性的各株系分离物, 5 种 PVY 株系或分离物 PVY^{NTN}、PVY⁰-FL、PVY⁰-RB、PVY^{N:0} 和 PVY^N 出现的频度和所占比例分别为 62 (55.9%)、26 (23.4%)、11 (9.9%)、9 (8.1%) 和 3 (2.7%)。表明样品中含有所有检测的 5 种 PVY 株系或分离物, 其中以 PVY^{NTN} 和 PVY⁰-FL 为主要流行的 PVY, 它们占总数的 79.3%。

PVY^{NTN} 在本次检测中发生频率如此高并非偶然, 在北美、中国等地相继报道 PVY^{NTN} 正有流行

的趋势^[13,14], 而且本次对其重组位点的分析显示, 所有检查的 PVY^{NTN} 都只发现两个重组位点而不是典型的三个重组位点, 从中国湖南分离的 PVY^{NTN} 也只检测出上述两个重组位点, 进一步分析显示该 PVY^{NTN} 的第三个重组位点的位置发生了变化, 导致检测失败^[8]。最近对 PVY⁰ 株系进一步依据致病力的强弱分为 PVY⁰-FL、PVY⁰-RB 两个亚型, 在加拿大等地的检测分析显示, 致病力更强的 PVY⁰-FL 正慢慢占据主要地位^[9,13], 本研究初步分析的结果也显示, 近七成 PVY⁰ 为 PVY⁰-FL 类型。

PVY 有复杂的株系类型, 是侵染马铃薯的主要病毒之一。本研究提供的 PVY 株系组成信息对本地区的 PVY 防治和品种选育工作具有一定的指导意义。

[参 考 文 献]

[1] Visser R G F, Bachem C W B, Boer J, *et al.* Sequencing the potato genome: Outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop [J]. *Am J Pot Res*, 2009, 86: 417-429.
 [2] Xu X, Pan S, Cheng S, *et al.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato [J]. *Nature*, 2011, 475 (7355): 189-195.

- [3] Jansky S, Jin L, Xie K, *et al.* Potato production and breeding in China [J]. *Potato Research*, 2009, 52: 57-65.
- [4] Whitworth J L, Nolte P, McIntosh C, *et al.* Effect of potato virus Y on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels [J]. *Plant Dis*, 2006, 90: 73-76.
- [5] Kerlan C. Potato viruses [M]//Brian W J M, Marc H V R. Desk encyclopedia of plant and fungal virology, 2008: 458-471.
- [6] Nie X, Singh R P. Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2003, 113: 69-77.
- [7] Piche L M, Singh R P, Nie X, *et al.* Diversity among potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States [J]. *Phytopathology*, 2004, 94: 1368-1375.
- [8] Hu X, He C, Xiao Y, *et al.* Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China [J]. *Arch Virol*, 2009, 154: 1303-1312.
- [9] Nie B, Singh M, Sullivan A, *et al.* Recognition and molecular discrimination of severe and mild PVY^O variants of potato virus Y in potato in New Brunswick, Canada [J]. *Plant Dis*, 2011, 95: 113-119.
- [10] Singh R P, Nie X, Singh M, *et al.* Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2002, 99: 123-131.
- [11] Nie X. Salicylic acid suppresses potato virus Y isolate N:O induced symptoms in tobacco plants [J]. *Phytopathology*, 2006, 96: 255-263.
- [12] Nie X, Singh R P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2002, 104: 40-54.
- [13] Nanayakkara U N, Singh M, Pelletier Y, *et al.* Investigation of potato virus Y (PVY) strain status and variant population in potatoes in New Brunswick, Canada [J]. *Am J Pot Res*, 2012, 89: 232-239.
- [14] 胡新喜, 雷艳, 何长征, 等. 湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析 [J]. *中国马铃薯*, 2012, 26(6): 358-361.

《中国马铃薯》杂志约稿函

《中国马铃薯》杂志是目前全国唯一的马铃薯专业科技期刊, 国际刊号: ISSN 1672-3635, 国内刊号: CN 23-1477/S, 邮发代号: 14-167, 国内外公开发行人。它以繁荣我国马铃薯产业为办刊宗旨, 积极报道国内外有关马铃薯的学术研究、科研动态和各种实用技术的最新消息。该刊由东北农业大学和中国作物学会主管, 由东北农业大学和中国作物学会马铃薯专业委员会主办。《中国马铃薯》(原名《马铃薯杂志》)创刊于1987年。2000年经申请报国家新闻出版总署审批, 更名为《中国马铃薯》, 同年改为大16开本, 并增加彩色广告。2001年《中国马铃薯》经报黑龙江省科委及省新闻出版局批准, 将原来的季刊改为双月刊。

《中国马铃薯》立足国内, 并刊登一些其他国家作者的英文稿件。它集学术性和技术性于一体, 是马铃薯科研、生产、经销单位和用户之间信息交流的一个平台。《中国马铃薯》不同于其他园艺类期刊, 刊登的文章全部是有关马铃薯的, 主要栏目包括: 遗传育种、栽培生理、病虫害防治、土壤肥料、产业开发、品种介绍、综述及其他。

该刊于2008年1月1日起开始执行作者在线投稿, 进一步提高了工作效率和办公自动化水平, 方便作者查询。欢迎专业委员会各位委员及广大读者踊跃投稿, 投稿时请登录《中国马铃薯》稿件远程处理系统。

网址: <http://mlsz.cbpt.cnki.net/WKA2/WebPublication/index.aspx?mid=mlsz>。

《中国马铃薯》杂志编辑部