

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2011)03-0166-04

病虫害防治

# PVY 株系间的分子变异及分子鉴定方法

杨庆东<sup>1</sup>, 吴兴泉<sup>2\*</sup>, 陈士华<sup>2</sup>, 刘晓磊<sup>2</sup>

( 1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319; 2. 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001 )

**摘要:** 马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY) 株系分化现象明显, 难于准确鉴定。本研究利用核酸序列分析工具对 PVY 主要株系的全基因组序列、*cp* 基因序列和 *p1* 基因序列进行了系统分析, 探明了 PVY 主要株系的分子特征。结果表明, 具有 PVY<sup>N</sup> 株系血清型的 PVY<sup>N</sup>、PVY<sup>NIN</sup> 株系与具有 PVY<sup>O</sup> 株系血清型的 PVY<sup>O</sup>、PVY<sup>N:O</sup>、PVY<sup>NW</sup> 株系间在 *cp* 基因第 50 位和第 86 位核苷酸处存在特异性分子变异; 将 *p1* 基因与 *cp* 基因联合进行序列分析可对 PVY 各主要株系进行准确的鉴定, 并建立了具体的分析方法。

**关键词:** 马铃薯 Y 病毒; 株系; 分子变异; 分子鉴定

## Molecular Variation and Identification of Potato Virus Y Strains

YANG Qingdong<sup>1</sup>, WU Xingquan<sup>2\*</sup>, CHEN Shihua<sup>2</sup>, LIU Xiaolei<sup>2</sup>

( 1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 2. College of Biotechnology, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China )

**Abstract:** Strain differentiation of potato virus Y(PVY) is obvious, and it is difficult to be identified. The complete genome, *cp* and *p1* genes of different PVY strains were analyzed with informatics tools, and the molecular variation characters among different PVY strains were proved up. It was confirmed that the nucleotide at 50 nt sites and 86 nt sites in *cp* gene was different among the strains which belong to PVY<sup>N</sup> serotype (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NIN</sup>) and PVY<sup>O</sup> serotype (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup>, and PVY<sup>NW</sup>). It was confirmed that the PVY strains could be identified with the analyses of combined nucleotide sequence of *p1* and *cp* genes, and the identification method was established.

**Key Words:** potato virus Y; strain; molecular variation; molecular identification

马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)是马铃薯上最常见、危害最重的病毒之一。PVY 是 RNA 病毒, 具有明显的株系分化现象。已被广泛认同的株系类型包括: PVY<sup>O</sup> 株系、PVY<sup>N</sup> 株系和 PVY<sup>C</sup> 株系。近年来, PVY 在欧洲、美洲等地区陆续发现了一系列的具有高致病性的 PVY 新株系。主要包括: PVY<sup>NIN</sup> 株系<sup>[1]</sup>, PVY<sup>NW</sup> 株系<sup>[2]</sup>, PVY<sup>N:O</sup> 株系<sup>[3]</sup>、PVY<sup>NA-NIN</sup> 株系<sup>[4]</sup>等。

PVY<sup>NIN</sup> 株系具有 PVY<sup>N</sup> 株系的血清型, 在烟草和马铃薯地上部引起的症状特点与 PVY<sup>N</sup> 株系相似<sup>[5]</sup>。但是, 该株系还可引起马铃薯块茎坏死环斑病

(Potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD), 在块茎的内部或外部引起环状、弧状坏死斑, 严重影响马铃薯的品质和经济价值, 这是 PVY<sup>O</sup> 株系和 PVY<sup>N</sup> 株系不具有的。PVY<sup>NW</sup> 株系和 PVY<sup>N:O</sup> 在烟草和马铃薯上可产生与 PVY<sup>N</sup> 株系相似症状, 但该株系却具有 PVY<sup>O</sup> 株系典型的外壳蛋白基因, 具有 PVY<sup>O</sup> 的血清型<sup>[6]</sup>。现在普遍认为这两个株系可能是同一株系, 近来有研究表明一些 PVY<sup>N:O</sup> 株系分离物也可引起非典型的马铃薯块茎坏死症状, 与 PVY<sup>NIN</sup> 株系相比症状较轻<sup>[7]</sup>。

PVY 不同株系间可能具有相同的血清型或生物

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金项目(2006210003); 河南工业大学校科研基金项目(07XJC008)。

作者简介: 杨庆东(1970-), 男, 高级农艺师, 从事马铃薯种薯生产研究。

\* 通信作者(Corresponding author): 吴兴泉, 副教授, 主要从事植物病毒学与分子生物学, E-mail: wuxq70@126.com。

学特性, 单独利用免疫学技术和接种鉴别寄主等方法均无法对各株系进行准确鉴定。以 PCR 技术、核酸杂交技术为核心的分子鉴定技术可能由于所选择的分子标记与 PVY 的生物学特性无关而导致在株系鉴定中出现误判。要实现 PVY 不同株系进行准确的分析与鉴定、更好的理解 PVY 不同株系产生的原因, 必须在全基因组水平上对发生重组(或突变)的基因进行详细研究, 明确不同株系间的分子变异情况<sup>[8]</sup>。本研究利用核酸序列分析工具对 PVY 主要株系的全基因组序列、*cp* 基因序列和 *p1* 基因序列进行了系统分析, 旨在探明 PVY 主要株系的分子特征, 建立更为准确的 PVY 株系鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 PVY 基因序列的获得与整理

从 Genbank 中查询已知株系类型的 PVY 不同分离物的全基因组序列、*cp* 基因序列和 *p1* 基因序列, 分别将全基因组序列、*cp* 基因序列和 *p1* 基因序列以 Fasta 格式保存在 3 个文本文件中。然后利用 Clustal X、BioEdit 等软件进行序列比对分析。

### 1.2 依据核苷酸序列建立 PVY 系统进化树

分别依据 PVY 全基因组序列、*cp* 基因序列和 *p1* 基因序列, 利用 Clustal X 软件建立 PVY 的系统进化树, 通过各系统进化树对 PVY 各株系的分类效果比较, 分析获得可对 PVY 不同株系进行准确鉴定的最佳核苷酸序列区。Clustal X 软件是 Clustal 多重序列比对程序的 Windows 版本, 它为进行多重序列对比、轮廓对比和结果分析提供了一个综合环境, 是目前公认的效果最好的多重序列比对软件。

### 1.3 株系特异性的 PVY 核苷酸变异位点分析

采用 BioEdit 软件对所有已知株系的 PVY 的全基因组、*cp* 基因和 *p1* 基因进行多序列比对, 从中分析出不同株系间各基因的分子变异情况, 分析找出具有明显株系特异性的核苷酸变异位点, 以用于 PVY 的分子鉴定。具体操作流程: 打开 BioEdit 软件, 从“File”菜单中选择“Open”打开待比对的序列的文件。然后在“Alignment”菜单中选择“Plot identities to first sequence with a dot”即可将所有分析序列与第一条序列进行比对, 对于同一位点上具有相同序列的以“.”来表示, 对于与第一条序列同一位点出现变异的显示该序列该位点的核苷酸。

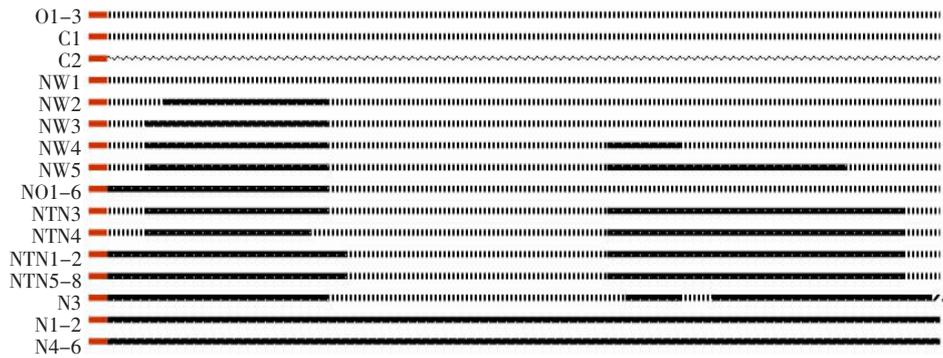
## 2 结果与分析

### 2.1 不同株系间全基因组的分子变异情况分析

通过对 Genbank 的查询, 获得了已株系类型的 PVY 全基因组序列 30 条。利用 BioEdit 软件对 30 个 PVY 分离物的全基因组序列进行比对。通过分析探明了各分离物基因组的主要结构特征, 结果表明: ①PVY 基因组 UTR 上游 0~42 bp 核苷酸序列在各株系间均保持高度保守性。②来自欧美的 PVY<sup>0</sup> 株系和 PVY<sup>N</sup> 株系间存在明显的分子差异, 具有各自不同的分子序列特征。③来自中国山东 PVY<sup>N</sup> 株系(N3)在 2 404~6 261 bp、7 035~8 567 bp 间重组了 PVY<sup>0</sup> 株系的序列, 其 3' 非编码区序列与其他任何分离物均不同, 具有明显的我国地域特征。④PVY<sup>C</sup> 株系和 PVY<sup>0</sup> 株系总相似性较高, 但与 PVY<sup>0</sup> 株系和 PVY<sup>N</sup> 株系均有不同。⑤PVY<sup>NW</sup> 株系与 PVY<sup>0</sup> 株系高度相似, 但在不同的区段重组了部分 PVY<sup>N</sup> 株系的序列, NW1 无明显的重组区, NW2 分离物和 NW3 分离物分别在 640~2 385 bp 和 490~2 385 bp 间重组了 PVY<sup>N</sup> 株系序列, NW4 分离物在 490~2 388 bp 间和 5 835~6 712 bp 间、NW5 分离物在 490~2 388 bp 间和 5 835~85 67 bp 间分别重组两段 PVY<sup>N</sup> 株系的序列。⑥PVY<sup>N0</sup> 株系与 PVY<sup>0</sup> 株系更为接近, 但在 50(42)~2 404 bp 间重组了 PVY<sup>N</sup> 株系的序列。⑦PVY<sup>NN</sup> 株系中 NTN1-2 和 NTN5-8 等 6 个分离物均与 PVY<sup>N</sup> 株系相似, 并分别在 2 385~5 835 bp、5 835~9 177 bp 间重组了 PVY<sup>0</sup> 株系序列。NTN3 分离物 42~492 bp、2385~5 835 bp 和 9177~9 698 bp 间重组了 PVY<sup>0</sup> 株系的序列, NTN4 分离物在 0~492 bp、2170~5 835 bp 和 9 177~9 698 bp 间重组了 PVY<sup>0</sup> 株系的序列(图 1)。

### 2.2 不同株系间 *cp* 基因的分子变异情况分析

从 Genbank 中检索获得已明确株系类型的 PVY *cp* 基因序列 87 条, 利用 Bioedit 软件对 87 条 *cp* 基因进行多序列比对, 证明具有 PVY<sup>0</sup> 株系血清型的 PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>N0</sup>、PVY<sup>NW</sup>、PVY<sup>C</sup> 株系在 *cp* 基因 5' 端第 50 位和 86 位核苷酸均不是 A, 而具有 PVY<sup>N</sup> 株系血清型的 PVY<sup>N</sup>、PVY<sup>NN</sup> 株系在 *cp* 基因 5' 端第 50 位或第 86 位为 A。PVY<sup>C</sup> 株系 *cp* 基因第 312 位核苷酸为 G, 而其他株系均为 A。PVY<sup>N</sup> 株系 *cp* 基因在第 645 位为 G, 其余株系均为 A, 上述分子特征在 87 条 *cp* 基因中符合度达 100%。



注：—：代表在各株系均高度保守的序列；—：代表 PVY<sup>N</sup> 株系特征序列；—：代表 PVY<sup>0</sup> 株系特征序列；—：代表 PVY<sup>C</sup> 株系特征序列；—：代表我国 N3 分离物的特征序列。编号中 C、O、NW、NO、NTN、N 分别代表该分离物为 PVY<sup>C</sup>、PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>NW</sup>、PVY<sup>N:0</sup>、PVY<sup>NTN</sup>、PVY<sup>N</sup> 株系。图中各基因组核苷酸序列编号对应的 Genbank 序列号(The Genbank numbers of the codes in figure)：C1: PVU09509; C2: AJ890348; O1: EF026074; O2: AJ58519; O3: AJ585196; NW1: EF558545; NW2: AM113988; NW3: AJ890350; W4: AJ889868; W5: AJ889867; NO1: DQ157178; NO2: DQ157179; NO3: EF026076; NO4: AY884985; NO5: AY745492; NO6: AY745491; NTN1: AJ585342; NTN2: AY884982; NTN3: AJ899866; NTN4: AJ890343; NTN5: AJ890344; NTN6: AJ890345; NTN7: AJ890347; NTN8: AY884982; N1: AY166867; N2: AY884983; N3: EU182576; N4:AJ585197; N5: X97895; N6: DQ157180。

Note: — represents the high conservative sequence; — represents the feature sequence of PVY<sup>N</sup>; — represents the feature sequence of PVY<sup>0</sup>; — represents the feature sequence of PVY<sup>C</sup>; — represents the feature sequence of N3 isolate in China. The code name of "C, O, NW, NO, NTN, N" represent "PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>NW</sup>, PVY<sup>N:0</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>N</sup>".

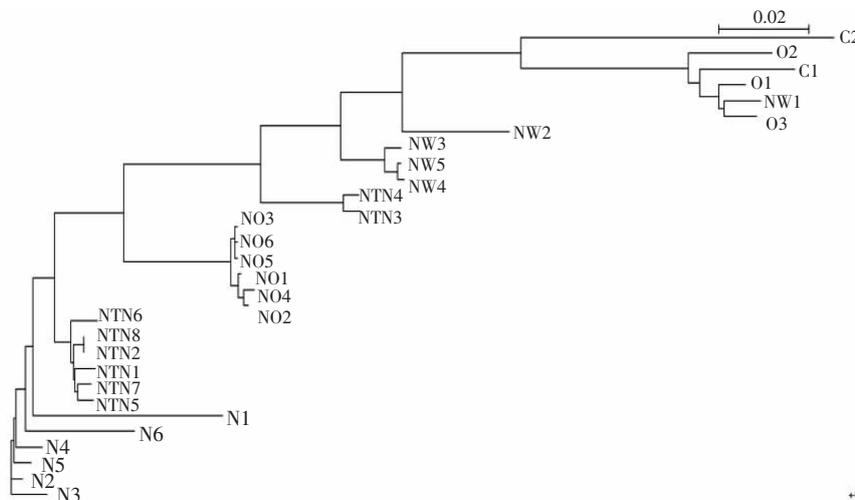
图 1 PVY 不同株系基因组结构

Figure 1 Genome structure of different PVY strains

利用 Clustal 软件建立 PVY 系统进化树，该系统进行树对 PVY<sup>N</sup> 株系、PVY<sup>NTN</sup> 株系和 PVY<sup>C</sup> 株系可进行准确的分类，但分析发现 PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>N:0</sup>、PVY<sup>NW</sup> 株系 *cp* 基因均保持高度相似性，采用系统进化树和核苷酸位点分析均无法准确将 3 个株系分开。

### 2.3 PVY 不同株系 *pI* 基因的分子变异情况分析

通过 Genbank 查询，获得已知株系类型的 *pI* 基因 70 条，并建立 PVY 系统进化树(图 2)。该系统进化树可将 PVY<sup>0</sup> 株系、PVY<sup>N:0</sup> 株系、PVY<sup>NW</sup> 株系进行有效的区分。核苷酸位点分析发现 PVY<sup>N:0</sup> 在 *pI* 基因区与 PVY<sup>0</sup> 株系间存在明显的分子变异，与



注：图中各基因组核苷酸序列编号对应的 Genbank 序列号同图 1。

Note: The Genbank numbers of the codes in figure 2 is the same as that in figure 1.

图 2 利用 *pI* 基因和 *cp* 基因联合组建的 PVY 系统进化树

Figure 2 The phylogenetic of the PVY constructed with the combined sequence of *pI* and *cp* genes

PVY<sup>N</sup> 株系高度相似。PVY<sup>NW</sup> 株系中除 NW1 分离物外, 在 *p1* 基因上游与 PVY<sup>0</sup> 株系保持高度相似, 在 *p1* 基因下游则转向与 PVY<sup>N</sup> 株系保持高度相似, 具有一个明显的 PVY<sup>0</sup> 株系和 PVY<sup>N</sup> 株系的重组位点。虽然 NW1 分离物的 *p1* 基因始终与 PVY<sup>0</sup> 株系保持高度一致, 但在第 780 位核苷酸处出现株系特异性变异。分析结果表明利用 *p1* 基因序列分析对 PVY<sup>N</sup> 株系、PVY<sup>NIN</sup> 株系、PVY<sup>NO</sup> 株系、PVY<sup>NW</sup> 株系的区分效果不好。

#### 2.4 利用 PVY *p1* 基因和 *cp* 基因联合分析建立了 PVY 不同株系的鉴定方法

通过上述研究可以看出, 分别依据 *cp* 基因和 *p1* 基因对 PVY 不同株系的鉴定效果具有互补性。因此, 将两者联合分析建立了 PVY 不同间的株系鉴定方法。

查询获得同时测定 *p1* 基因和 *cp* 基因序列的 PVY 分离物共 30 条, 依据 *p1* 基因和 *cp* 基因联合后的核苷酸序列建立 PVY 的系统进化树, 该系统进化树可将 PVY<sup>NO</sup>、PVY<sup>NW</sup>、PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>N</sup>、PVY<sup>NIN</sup> 株系分开, 分类效果较好(30 个分离物只有 PVY<sup>NW</sup> 株系的 NW1 和 PVY<sup>C</sup> 株系的 C1 出错, 准确率为 93.3%)。

### 3 讨论

目前对 PVY 株系的检测与鉴定技术主要有以下几种方法: 一是传统生物学鉴定, 主要采用接种普通烟后观察其症状表现而定, 如果使普通烟出现叶脉坏死症状则为 PVY<sup>N</sup> 株系, 如使普通烟叶片出现花叶症状则为 PVY<sup>0</sup> 株系。第二种方法是采用单克隆抗体进行, 目前可见的 PVY 单克隆抗体只有 PVY<sup>N</sup> 和 PVY<sup>0</sup> 株系的单克隆抗体。第三种方法是通过 RT-PCR 方法结合对 PCR 产物序列分析进行。

随着对 PVY 新株系的发现, 单独采用上述检测方法已无法对 PVY 的各株系类型其进行准确的鉴定。例如, PVY<sup>NIN</sup> 株系、PVY<sup>NO</sup> 株系、PVY<sup>NW</sup> 株系都可以引起烟草叶脉坏死, 与 PVY<sup>N</sup> 完全相同, 单纯利用接种普通烟的方法无法将其分开。PVY<sup>NO</sup> 株系、PVY<sup>NW</sup> 株系均可与 PVY<sup>0</sup> 株系的抗体产生免疫学反应, PVY<sup>NIN</sup> 株系可与 PVY<sup>N</sup> 的抗体产生免疫学反应, 单独利用血清进行的株系鉴定(即使使用的是单克隆抗体)是无法得出明确结论。利用 RT-PCR 技

术结合 PCR 核苷酸序列分析进行 PVY 鉴定中, 我国已报道的相关研究均采用 BLAST 软件通过对 Genbank 中相关基因序列的相似对比来判断所得 PVY 分离物的株系。目前 PCR 扩增的标序列以 *cp* 基因或其部分序列最多, *p1* 基因序列也有较多报道。通过本研究成果可以看出, 采用某条基因在不同株系间进行的两两比对所得出的结论非常不准确, 例如: PVY<sup>NO</sup> 株系、PVY<sup>NW</sup> 株系与 PVY<sup>0</sup> 株系几乎具有完成相同的 *cp* 基因, 采用 BLAST 单独分析某一基因序列时无法确定其真正的归属。

本研究证实, 利用 *cp* 基因和 *p1* 基因序列联合分析可实现 PVY 所有株系的准确鉴定。所建立的基于 *p1* 基因和 *cp* 基因序列的 PVY 株系鉴定检索表在知道 PVY 分离物的 *p1* 基因和 *cp* 基因序列的条件下可准确确定其株系归属, 为该病害的有效防治提供了理论依据和技术支撑, 目前尚未见此方面的研究报道。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Beczner L, Horvath H, Romhanyi L, et al. Etiology of tuber ring spot disease in potato [J]. *Potato Res*, 1984, 27: 339-351.
- [ 2 ] Chrzawska M. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland [J]. *Potato Res*, 1991, 34: 179-182.
- [ 3 ] 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: 41-54.
- [ 4 ] Lorenzen J H, Meacham T, Berger P H, et al. Whole genome characterization of potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151: 1055-1074.
- [ 5 ] Tribodet M, Glais L, Kerlan C, et al. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 2101-2105.
- [ 6 ] Chikh A M, Maoka T, Natsuaki K T. A point mutation changes the serotype of a potato virus Y isolate; genomic determination of the serotype of PVY strains [J]. *Virus Genes*, 2007, 35(2): 359-367.
- [ 7 ] Piche L M, Singh R P, Nie X, et al. Diversity among PVY field isolates obtained from potatoes grown in the United States [J]. *Phytopath*, 2004, 94: 1368-1375.
- [ 8 ] Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A. Genetic structure of a population of potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations [J]. *Virus Res*, 2008, 131(2): 199-212.