

马铃薯 Y 病毒的株系种类、分子特征 及鉴定方法研究进展

吴兴泉¹,李 月¹,孙 强²,李萌萌¹,王梦科¹
(1.河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001;
2.黑龙江北大荒农业股份有限公司 八五四分公司,黑龙江 虎林 158403)

摘要:马铃薯 Y 病毒(PVY)株系分化现象明显,具有多个株系类型。随着分子生物学技术和免疫学技术逐渐被引入 PVY 的株系鉴定中,产生了一系列的株系鉴定方法。为此,对 PVY 的主要株系、亚株系的种类及分类依据、分子特征以及近年来应用于 PVY 株系鉴定的传统生物学方法、分子生物学方法、免疫学方法等进行了综述。
关键词:马铃薯 Y 病毒;株系;分子特征;鉴定
中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)03-0005-04

Review on Types, Molecular Characters and Identification Methods of Potato Virus Y Strains

WU Xingquan¹, LI Yue¹, SUN Qiang², LI Mengmeng¹, WANG Mengke¹
(1. College of Biotechnology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
2. 854 Branch of Heilongjiang Great Northern Wilderness Agriculture Co., Ltd., Hulin 158403, China)

Abstract: There are many strains of potato virus Y (PVY) identified in the last few decades. As molecular technology and immunity technology were applied in the identification of the PVY strains, a series of strain identification methods were developed. Here the types of the strains and substrains, molecular characters and the identification methods of PVY are reviewed.
Key words: potato virus Y; strain; molecular character; identification

马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 是马铃薯上危害最严重的病毒之一,可造成马铃薯严重减产。作为 RNA 病毒,PVY 具有极高的分子变异性,加之 PVY 的寄主范围很广,不同的寄主具有不同的抗病遗传背景,这也促使 PVY 必须通过基因突变、基因重组等方式形成高度的遗传多样性以应对不同的寄生环境^[1]。目前,PVY 已经分化形成了多种不同的株系类型,它们在毒力、侵袭力、传播能力、基因型、血清型等方面具有非常大的差异^[2-3],对寄主造成的危害也不同。例如,PVY 的一些新株系可引致马铃薯产生块茎坏死环斑病 (potato tuber necrotic ring-spot disease, PTNRD),使马铃薯块茎形成坏死环斑,严重影响马铃薯的产量和品质。在欧美地区对这些

PVY 株系的研究很多,而我国相关的研究报道较少。为此,对 PVY 的主要株系、亚株系的种类及分类依据、分子特征以及近年来应用于 PVY 株系鉴定的传统生物学方法、分子生物学方法、免疫学方法等进行了综述,以期为我国相关研究工作的开展提供理论支撑。

1 PVY 的株系种类及各株系的分类依据

20 世纪 70 年代,PVY 分离物主要被划分为 3 个株系:PVY^C 株系、PVY^O 株系和 PVY^N 株系。这 3 个株系的分类依据是病毒对具有不同抗病基因的马铃薯品种的致病性(表 1),其中在侵染携带抗病

收稿日期:2014-09-12
基金项目:河南省高校科技创新人才支持计划(2012HASTIT016)
作者简介:吴兴泉(1970-),男,黑龙江克山人,教授,博士,主要从事分子生物学与植物病毒学研究。
E-mail:wuxq70@126.com

基因 *Nc* 的马铃薯品种(如 King Edward)时引起过敏反应的 PVY 分离物称为 PVY^C 株系;在侵染携带抗病基因 *Nc* 的马铃薯品种(如 King Edward)时不能引起过敏反应,但可在携带抗病基因 *Nytr* 的马铃薯品种(如 Desiree 和 Maris Bard)上引起过敏反应的 PVY 分离物称为 PVY^O 株系^[4];可以克服上述 2 个抗病基因(*Nc* 和 *Nytr*),不会在携带这 2 个抗病基因的马铃薯品种上产生过敏反应的 PVY 分离物称为 PVY^N 株系^[1,5]。PVY^N 株系在大多数马铃薯品种上引起轻微症状,但可从马铃薯叶片快速传至块茎,另外,PVY^N 株系可以引起烟草(*Nicotiana tabacum*)叶脉坏死。

表 1 PVY 主要株系类型及其分类依据

株系	分类依据
PVY ^C	在具有抗病基因 <i>Nc</i> 的马铃薯品种上引起过敏反应
PVY ^O	可以克服抗病基因 <i>Nc</i> ,但可在具有抗病基因 <i>Nytr</i> 的马铃薯品种上引起过敏反应
PVY ^N	可以克服马铃薯抗病基因 <i>Nc</i> 和 <i>Nytr</i> ,可引起烟草叶脉坏死症状
PVY ^Z	可以克服 <i>Nytr</i> 和 <i>Nc</i> 基因,但在具有抗病基因 <i>Nz</i> 的马铃薯品种上引起过敏反应
PVY ^E	可以克服具有抗病基因 <i>Nz</i> 的马铃薯品种的抗病性

到 20 世纪 90 年代,1 个新的 PVY 株系被鉴定出来,该株系可以克服 *Nytr* 和 *Nc* 基因,但在具有抗病基因 *Nz* 的马铃薯品种(如 Maris Bard 和 Pentland Ivory)上可以引起过敏反应,这个株系被称为 PVY^Z^[6](表 1)。后来又鉴定出 PVY^E 株系,该株系可以克服具有抗病基因 *Nz* 的马铃薯品种(如 Maris Bard)的抗病性^[7-8](表 1)。虽然 PVY^Z 株系和 PVY^E 株系的发生、分布及重要性均尚未见报道,但在一些文献中仍将 PVY^Z 和 PVY^E 株系与 PVY^C 株系、PVY^O 株系和 PVY^N 株系一同被指定为 PVY 的株系类型^[1]。

然而,在近年来发表的有关 PVY 株系的论文中,除了一些综述性论文外,研究性论文几乎都忽略了 PVY^C 株系、PVY^Z 株系和 PVY^E 株系,主要对 PVY^N 株系和 PVY^O 株系展开研究,特别是近年发现的由 PVY^N 株系和 PVY^O 株系通过基因突变或重组演变而成的一些新的亚株系类型已经成为研究热点。在这些新的亚株系类型中以 PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 的研究报道最多,它们在近 30 a 内才被发现,但目前已经遍布世界。PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 等亚株系均可引起烟草产生叶脉坏死症状,因此均为 PVY^N 株系的亚株系。PVY^{NTN} 亚株系的分类依据是该株系能够引起 PTNRD; PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 亚株系的分类依据是具有 PVY^N 株系的生物学特性、具有 PVY^O 株系的血清型,有研究认为 PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 亚株系的遗传特性及生物学特性

几乎完全相同,因此将这 2 个亚株系合并为 1 个亚株系^[9-13]。PVY^O-05 是最近报道的 PVY^O 株系的一个亚株系,该亚株系具有 PVY^O 株系的生物学特性,但具有 PVY^N 株系的血清型^[14](表 2)。

表 2 PVY 主要亚株系类型及其分类依据

亚株系	所属株系	分类依据
PVY ^{NTN}	PVY ^N	引起马铃薯坏死环斑病
PVY ^{N-Wi} (PVY ^{N:0})	PVY ^N	具有 PVY ^O 的血清型
PVY ^O -05	PVY ^O	具有 PVY ^N 的血清型

上述 PVY^{NTN} 亚株系的分类依据,经研究证明存在一定的误差,例如除 PVY^{NTN} 亚株系外,一些其他的 PVY 亚株系在一些敏感的马铃薯品种上也可引起 PTNRD^[15],如在美国发现的 PVY-L26 分离物对马铃薯的致病性显示为 PVY^Z 株系特征,但它却可引起 PTNRD,这一点类似 PVY^{NTN} 亚株系,但它在烟草上只引起花叶症状,这一点又与 PVY^{NTN} 亚株系不同。这说明 PVY 引致 PTNRD 与引致烟草叶脉坏死这 2 个生物学特性并不相关联^[16],也揭示了这些 PVY 不同株系在生物学特性和遗传特性方面的复杂性,部分亚株系的分类依据还需要进一步完善。

2 PVY 各株系的分子特征

PVY^O 株系与 PVY^N 株系的全基因组(全长 9.7 kb)序列差异明显,两者间核苷酸序列存在约 8% 的分子变异。近年来新发现的多个亚株系均为 PVY^O 株系与 PVY^N 株系通过基因重组或基因突变产生。通过基因重组产生的亚株系分别由 PVY^O 株系的基因片段和 PVY^N 株系的基因片段重组而成,不同的亚株系的基因组中具有不同数量的重组位点。PVY^{NTN} 亚株系的基因组中一般含有 3 个重组位点,少数含有 4 个重组位点。PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 亚株系基因组中一般含有 1~2 个重组位点^[1,9-11],偶见具有 3 个重组位点的 PVY^{N:0} 分离物^[17]。上述 3 个重组型 PVY 亚株系的基因组中 2 406—5 821 nt 片段均为 PVY^O 株系基因片段,基于此段基因序列建立的系统进化树显示,PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 亚株系基因组中包含的 PVY^O 株系基因片段分别来自 PVY^O 株系的 2 个不同分支,PVY^{N-Wi} 亚株系中的 PVY^O 株系基因片段来自 PVY^O 株系,而 PVY^{N:0} 亚株系中的 PVY^O 株系基因片段来自 PVY^O-05 亚株系^[14],由此可见,PVY^{N-Wi} 和 PVY^{N:0} 亚株系在基因序列上存在较为明显的差异。PVY^{NTN} 亚株系基因组中包含的 PVY^O 株系基因片段最初认为是来自 PVY^O 株系^[16,18],后有研究认为来自 PVY^{N:0} 亚株系^[14]。

在基于全基因组序列建立的 PVY^O 株系系统进化树中,PVY^O-05 亚株系可形成一个单独的分支,说明 PVY^O-05 亚株系是 PVY^O 株系中新演化形成

的一个分支,与其他PVY⁰株系分离物间的全基因组序列存在明显差异^[14]。

PVY-L26分离物的生物学特性显示其为PVY^Z株系,它的基因组含有典型的欧洲PVY^{NTN}亚株系所具有的3个重组位点^[1,18],其辅助蛋白(HC-Pro)也具有氨基酸K400和E419,这2个氨基酸位点被认为是引起烟草叶脉坏死症状的关键位点,但此分离物却不能引致烟草叶脉坏死,说明还有其他功能位点参与了PVY引致烟草叶脉坏死的症状形成^[5,19]。PVY NE-11分离物由PVY^N株系和1株尚未明确分子特征的PVY分离物重组形成^[12]。感染辣椒的PVY nnp分离物同时具有PVY^N株系、PVY⁰株系和PVY^C株系的部分序列特征^[13]。

目前,关于PVY重组型新亚株系间的相互作用、基因重组机制及基因重组与生物学性状间的关系等问题仍未解决^[9,12,18]。

3 PVY株系的鉴定方法

3.1 接种鉴别寄主

PVY不同株系在具有不同抗病基因的马铃薯品种上会引起不同的症状,可以作为鉴定依据区分不同的PVY株系(如上所述)。PVY^N株系(包括PVY^{N-Wi}和PVY^{NTN}亚株系)均可引起烟草的叶脉坏死症状,而PVY^C、PVY⁰株系(包括PVY⁰-O5亚株系)不能引起烟草的叶脉坏死症状,利用鉴别寄主烟草也可为株系鉴定提供辅助作用。

3.2 依据PVY基因序列差异

随着越来越多的PVY基因组序列被测定,PVY株系的核苷酸序列变异情况日渐清晰,依据不同株系间的特征性分子变异序列可以建立PVY不同株系的鉴定方法。最初依据各株系特异性核苷酸变异位点设计探针建立了鉴定PVY^N株系的PCR-RFLP(限制性片段长度多态性)技术和核酸分子杂交检测技术^[13,19]。随后依据各株系的特征性核苷酸位点设计PCR引物,建立了PVY不同株系的一系列RT-PCR(反转录-聚合酶链式反应)检测技术^[20-24]。研究表明,RT-PCR检测技术具有高度的灵敏性,可以对单独侵染或混合侵染的PVY各株系进行可靠的检测^[25],而且采用RT-qPCR(荧光定量PCR)技术还可对待测样本中PVY的含量进行快速而准确地测定,即使在样本中病毒含量非常少、还未表现症状的情况下也可进行准确地早期诊断^[24]。依据PVY基因组中具有株系特异性的核苷酸变异位点T/C9259、A/C2271、G/C8573和A/G2213建立了PVY各株系的单核苷酸多态性检测技术SNaPshot,可以有效地区分PVY^N、PVY⁰、PVY^{N-Wi}和PVY^{NTN}等PVY株系或亚株系^[26]。对RT-PCR鉴

定技术和SNaPshot鉴定技术在PVY株系鉴定中的应用效果进行综合评价,结果证明SNaPshot技术的检测范围更宽^[27],而RT-PCR技术对PVY^{NTN}亚株系的鉴定效果更可靠。

总体来说,依据基因特征建立的PVY株系鉴定方法的准确性取决于所选择的株系特异性核苷酸变异位点是否正确。

3.3 免疫学鉴定技术

应用于PVY株系鉴定的单克隆抗体主要是利用PVY外壳蛋白(CP)制备的PVY⁰株系和PVY^N株系的单克隆抗体,可以有效地识别PVY⁰株系和PVY^N株系。但随着重组型新亚株系的发现,利用单克隆抗体进行亚株系检测时,检测结果不够准确。例如PVY^{N-Wi}、PVY^{N:0}亚株系和PVY⁰株系都可与PVY⁰株系的单克隆抗体反应,PVY^{NTN}、PVY⁰-O5亚株系和PVY^N株系都可与PVY^N株系的单克隆抗体反应,这样就无法明确判断待测样本到底属于哪个株系或亚株系。虽然免疫学方法还存在很多不足,但仍然是PVY株系鉴定中重要的辅助手段。

4 讨论

随着PVY分子生物学的深入研究和免疫学检测技术的提高,相关的检测鉴定方法也不断被引入到PVY的株系、亚株系鉴定中,继而发现、命名了多种PVY亚株系类型。目前对PVY不同株系的鉴定依据主要有3个:一是依据PVY在寄主上的致病性,二是依据PVY的基因序列特征,三是依据PVY的血清型(即与已知的单克隆抗体的免疫反应)。这些方法的应用虽然为PVY的精准鉴定提供了更为丰富的科学依据,但由于3个鉴定依据间并不存在必然的相关性,导致目前PVY株系、亚株系的分类较为混乱。例如前期命名的PVY^{NTN}亚株系,其分类依据是可引起马铃薯产生PTNRD,但近年研究发现少部分PVY^{N-Wi}和PVY^{N:0}亚株系的分离物和少数PVY⁰株系的分离物也均可引起PTNRD^[15,28],这使得PVY^{NTN}亚株系的分类依据变得不确定,也使PVY引致PTNRD的分子机制变得更加扑朔迷离。由于目前仍无法明确PVY基因组中与PTNRD相关的核苷酸变异位点,所以也无法依据基因序列特征鉴定与PTNRD相关的PVY分离物。曾有研究证明,利用HC-Pro基因中与烟草叶脉坏死相关的核苷酸位点(2 213位和2 271位,编码氨基酸K400和E419)^[5]可以建立RT-PCR检测方法,用于鉴定PVY分离物能否引起烟草叶脉坏死^[29],但该方法对PVY-L26分离物并不适用。出现上述混乱局面的主要原因是鉴定依据过多,加之PVY所具有的多种不同致病性的分子机制尚未明确,致使PVY的株系

鉴定方法目前还不够完善,这也是未来 PVY 株系研究中有待于解决的问题之一。

参考文献:

- [1] Singh R P, Valkonen J P, Gray S M, *et al.* Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato[J]. *Arch Virol*, 2008, 153:1-13.
- [2] Blanchard A, Rolland M, Lacroix C, *et al.* *Potato virus Y*: A century of evolution[J]. *Curr Top Virol*, 2008, 7: 21-32.
- [3] Glais L, Kerlan C, Robaglia C. Variability and evolution of *Potato virus Y* (PVY), the type-member of the *Potyvirus* genus [M]//Khan J A, Dijkstra J. *Plant viruses as molecular pathogens*. Binghamton, NY: The Haworth Press, Inc., 2002:225-253.
- [4] Celebi-Toprak F, Slack S A, Jahn M M. A new gene, *Nytr*, for hypersensitivity to *Potato virus Y* from *Solanum tuberosum* maps to chromosome IV[J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104:669-674.
- [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^N isolates in infected *N. tabacum* cv. Xanthi[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86:2101-2105.
- [6] Jones R A C. Strain group specific and virus hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars[J]. *Ann Appl Biol*, 1990, 117:93-105.
- [7] Chikh-Ali M, Rowley J S, Kuhl J, *et al.* Evidence of a monogenic nature of the *Nz* gene conferring resistance against *Potato virus Y* strain Z (PVY^Z) in potato[J]. *American Journal of Potato Research*, 2014, 91(6): 649-654.
- [8] Kerlan C, Tribodet M, Glais L, *et al.* Variability of *Potato virus Y* in potato crops in France[J]. *J Phytopathol*, 1999, 147:643-651.
- [9] Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): Evidence that PVY^{N-W} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY⁰ and PVY^N isolates[J]. *Arch Virol*, 2002, 147:363-378.
- [10] 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 and Canada[J]. *Arch Virol*, 2006, 151: 1055-1074.
- [11] Nie X, Singh R P, Singh M. Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the *Potato virus Y* from Manitoba, Canada[J]. *Can J Plant Pathol*, 2004, 26:573-583.
- [12] Lorenzen J H, Nolte P, Martin D, *et al.* NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*[J]. *Arch Virol*, 2008, 153:517-525.
- [13] Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewski J. Differentiation of *Potato virus Y* using improved sets of diagnostic PCR-primers[J]. *J Virol Methods*, 2007, 140: 66-74.
- [14] Karasev A V, Hu X J, Brown C J, *et al.* Genetic diversity of the ordinary strain of *Potato virus Y* (PVY) and origin of recombinant PVY strains[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(7):778-785.
- [15] Gray S M, DeBoer S H, Lorenzen J, *et al.* *Potato virus Y*: A significant and evolving threat to potato crops in the United States and Canada[J]. *Plant Dis*, 2010, 94: 1384-1397.
- [16] Hu X, Meacham T, Ewing L, *et al.* A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco[J]. *Virus Res*, 2009, 143:68-76.
- [17] Gao F, Chang F, Shen J, *et al.* Complete genome analysis of a novel recombinant isolate of *Potato virus Y* from China[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12):3439-3442.
- [18] Hu X, Karasev A V, Brown C J, *et al.* Sequence characteristics of *Potato virus Y* recombinants[J]. *J Gen Virol*, 2009, 90:3033-3041.
- [19] Kerlan C, Nikolaeva O V, Hu X J, *et al.* Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVY^Z: Genetic typing of PVY^{Z-NTN}[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(9):1052-1060.
- [20] Rosner A, Maslenin L. Differentiating PVY(NTN) from PVY(N) by annealing to reference RNA transcripts[J]. *J Virol Methods*, 2001, 97:125-131.
- [21] Mallik I, Anderson N R, Gudmestad N C. Detection and differentiation of *Potato virus Y* strains from potato using immunocapture multiplex RT-PCR[J]. *Am J Potato Res*, 2012, 89: 184-191.
- [22] Chikh A M, Maoka T, Natsuaki K T. The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN}[J]. *J Phytopathol*, 2007, 155: 409-415.
- [23] Rigotti S, Gugerli P. Rapid identification of *Potato virus Y* strains by one-step triplex RT-PCR[J]. *J Virol Methods*, 2007, 140: 90-94.
- [24] Kogovsek P, Gow L, Pompe-Novak M, *et al.* Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates[J]. *J Virol Methods*, 2008, 149: 1-11.
- [25] Lorenzen J H, Piche L M, Gudmestad N C. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures[J]. *Plant Dis*, 2006, 90: 935-940.
- [26] Rolland M, Glais L, Kerlan C, *et al.* A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable *Potato virus Y* group and variant characterization[J]. *J Virol Methods*, 2008, 147: 108-117.
- [27] Rupar M, Kogovsek P, Pompe-Novak M, *et al.* Assessment of SNaPshot and single step RT-qPCR methods for discriminating *Potato virus Y* (PVY) subgroups[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 189: 93-100.
- [28] Jacquot E, Tribodet M, Croizat F, *et al.* A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of Y⁰ and Y^N isolates of *Potato virus Y* (PVY)[J]. *J Virol Methods*, 2005, 125: 83-93.
- [29] Lindner K, Kellermann A. Analyses of the actually strain spectrum in Bavaria and its variation in virulence and symptoms [J]. *Julius-Kühn-Archiv*, 2012, 438: 301.