

# 烟草脉带花叶病毒云南分离物全基因序列分析

秦西云<sup>1</sup>, 卢训<sup>2</sup>, 方琦<sup>2</sup>, 尹跃艳<sup>2</sup>, 丁铭<sup>2\*</sup>, 张仲凯<sup>2</sup>

(1. 云南省烟草农业科学研究院, 昆明 650031; 2. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南农业基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223)

**摘要:** 应用电子显微镜负染色法在烟草叶片斑驳、脉间褪绿病样中观察到马铃薯 Y 病毒属病毒粒子, 通过马铃薯 Y 病毒属兼并引物扩增获得目的片段, 序列分析表明病样中病原体为 TVBMV, 命名为 YN-YX-TVBMV。根据 GenBank 已知序列, 分别合成引物, 对 YN-YX-TVBMV 进行克隆及测序, 得到一条 6047 bp 的不完整的病毒基因组核苷酸序列, 将该序列与国内报道的 TVBMV 全基因序列进行对比分析发现该分离物与报道的 TVBMV 其他分离物具有明显的地域分布差异, 即云南获得的分离物均独立聚为一簇。

**关键词:** 烟草脉带花叶病毒; 全基因; 分析

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2015) 05-0044-03

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2015.05.008

## Analysis of the complete genomic sequence of an isolate of *Tobacco vein banding mosaic virus* from Yunnan

QIN Xiyun<sup>1</sup>, LU Xun<sup>2</sup>, FANG Qi<sup>2</sup>, YIN Yueyan<sup>2</sup>, DING Ming<sup>2\*</sup>, ZHANG Zhongkai<sup>2</sup>

(1. Yunnan Agricultural Academy of Tobacco Research, Kunming 650031, China; 2. Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Province Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Key Lab of the Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China)

**Abstract:** The virus was first observed from *Potyvirus* with electron microscope. The virus was then identified as TVBMV by RT-PCR using primers M4 and Sprimers. The primers were designed using the genomic sequence of the 3' end of *Potyvirus*. The isolate was named YN-YX-TVBMV. A 6047 bp sequence was obtained from eight segments of YN-YX-TVBMV. This sequence was used to compare with TVBMV isolates from China. The results indicated that significant sequence variation existed among TVBMV isolates from different locations with the isolates from Yunnan Province always formed a separate group.

**Keywords:** TVBMV; complete genomic sequence; analysis

烟草脉带花叶病毒 (*Tobacco vein banding mosaic virus*, TVBMV) 是马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*) 马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的一个确定种, 以蚜虫非持久性传播, 也可以通过机械接种传播<sup>[1]</sup>。2004—2006 年 Tian 等<sup>[2]</sup>对中国四大烟草主产区的烟草病毒病进行了调查, 结果显示, TVBMV 中国分离物中, 云南分离物与其他中国分离物具有明显的遗传多样性差异; 2011 年 Zhang 等<sup>[3]</sup>再次对 40 个 TVBMV 分离物进行全基因序列分析, 也发现了中国大陆的 TVBMV 分离

物之间存在频繁的基因交流, 且云南的分离物单独聚为一支, 分为一组, 组内也存在频繁的基因交流。2013 年, 本实验室得到一个采自云南玉溪的 TVBMV 样品, 于是对该样品进行了系统鉴定和全基因序列测定分析, 现将实验结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

样品于 2013 年 8 月采自云南省玉溪市研和田间, 品种为云烟 87, 病样典型症状为叶片斑驳、

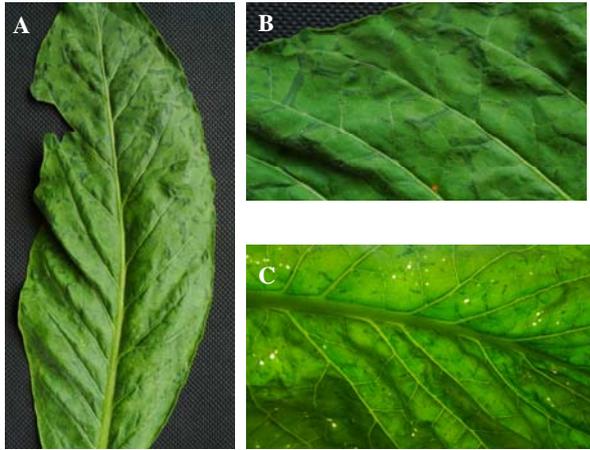
基金项目: 中国烟草总公司科技项目“全国烟草有害生物调查”(110200902065); 云南省烟草公司项目“云南烟草有害生物调查”(2010YN19)

作者简介: 秦西云 (1963-), 男, 研究员, 主要从事烟草病虫害防控技术研究。E-mail: xyqin@yntsti.com。\*通信作者, E-mail: mingd73@163.com

收稿日期: 2014-10-17

修回日期: 2015-07-30

沿支脉绿岛、脉间褪绿、叶片轻微皱缩（图 1）。



注：A：明显脉带花叶症状的烟草叶片；B：明显脉带花叶的烟草叶片局部症状；C：只有对光才能看见叶脉上绿斑的烟草叶片局部症状

图 1 样品典型症状

Fig. 1 The typical symptoms of samples

1.2 方法

1.2.1 电镜负染色观察 取少量感病材料用刀将叶片切碎，加入少量 3%戊二醛固定，将铜网放在样品汁液上吸附 3~5 min，取出吸附有病毒汁液的铜网，用滤纸吸干后，将吸附有样品的一面朝上放置，风干 1 min，再放入 2%钼酸铵（pH 5.5）中染色 5 min，晾干后置于透射电子显微镜下观察。

1.2.2 分子生物学 （1）马铃薯 Y 属病毒鉴定：采用氯化锂沉淀法提取植物总 RNA，用 M4-T（GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTT）引物和 Promega 公司的 M-MLV 反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，再取 2 μL 反转录产物用引物 M4（GTTTTCCCAGTCACGAC）和 Sprimers（GGNAAYAYAGYGGNCARCC）<sup>[4]</sup>PCR 扩增时 50 °C 退火 5 个循环，再 53 °C 退火 30 个循环。PCR 产物应为 1800 bp 左右，克隆该片段，并测序。（2）TVBMV 全基因组序列扩增：采用氯化锂沉淀法提取植物总 RNA，用表 1 中反向引物和 Promega 公司的 M-MLV 反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，取 2 μL 反转录产物用表 1 中正向引物的引物和反向引物进行 PCR 扩增，扩增时各对引物的退火温度见表 1。克隆符合大小的目的片段，并测序。

表 1 用于扩增 TVBMV 的引物序列

Table 1 The primer sequences for TVBMV

引物名称	引物序列	退火温度/°C
TVBMV900-F	5'-CAGCAAGTTAAGAAGGGTATGAGTG-3'	60
TVBMV1848-R	5'-CCAAATCCGCGGGAGAATCA-3'	
TVBMV1838-F	5'-GCGGAATTTGGATACGCTGAT-3'	60
TVBMV3087-R	5'-AGTTGCCTGTGCATATTGCTT-3'	
TVBMV-2822F	5'-GGTGCAAATCGCTGTAGCTG-3'	58
TVBMV-3916R	5'-TTTCTGATCCCACTGCACC-3'	
TVBMV-3777F	5'-ATGGGTCGGACCATACTCA-3'	58
TVBMV-6300R	5'-GATCGACCCCTCAACCAAG-3'	
TVBMV6896-F	5'-TTGGGCACGAGGTTGAAA-3'	60
TVBMV7736-R	5'-CTGAAGCAAAGTGTCCCATCC-3'	
TVBMV5848-F	5'-CCGCATATACAAAGAAGGCA-3'	60
TVBMV7046-R	5'-CCACCTCTCATGTGATTGTTCTC-3'	
TVBMV-7266F	5'-ATCGAGGTCGGTGTGGTAGA-3'	58
TVBMV-9050R	5'-GAATGTTGGTTTGGCGTGCT-3'	
TVBMV-8059F	5'-ACTGCGCTTTCGTTGCAAAT-3'	58
TVBMV-9382R	5'-ACGCCACTCACCAAGTAG-3'	

2 结果

2.1 电镜观察结果

应用电子显微镜负染色法，在病原汁液中观察到大小约 13×700~900 nm 的线状病毒粒子，且只有这一种病毒存在。初步判断为 Potyvirus 属病毒<sup>[5]</sup>。

2.2 分子生物学结果

2.2.1 马铃薯 Y 病毒属病毒鉴定结果 Trizol 法提取病样总 RNA，以 M4-T 为引物反转录，引物 M4 和 sprimers 进行 PCR 扩增。得到约 1800 bp 的目的片段，克隆该片段，并测序。测序结果表明，供试样品总 RNA 中检测到烟草脉带花叶病毒基因序列，该序列与国内报道的 YN9.1 分离物（GenBank：KF444434.1）同源性为 99%。

2.2.2 TVBMV 全基因组序列扩增结果 供试样品总 RNA 用表 1 中反向引物和 Promega 公司的 M-MLV 反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，取 2 μL 反转录产物用表 1 中正向引物和反向引物进行 RT-PCR 扩增，得到的目片段，克隆和测序。拼接以上序列获得一条 6047 bp 的不完整的 TVBMV 基因组序列，命名为 YN-YX-TVBMV。使用 MEGA 5.0 软件将该序列与 GenBank 中注册的 TVBMV 全基因序列进行多序列对比，之后采用差异位点距离（p-distance）估计它们的进化距离，结果表明 YN-YX-TVBMV 与登录号为 KF444434.1 的全基因序列进化距离最近（表 1）。

进一步加入马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 全基因序列 (GenBank :NC\_001616.1) 进行对比, 构建系统进化树。结果显示, PVY 作为同属不同

种的病毒, 系统进化关系较远, YN-YX-TVBMV 与进化距离最近的 KF444434.1 聚在一起 (图 2)。

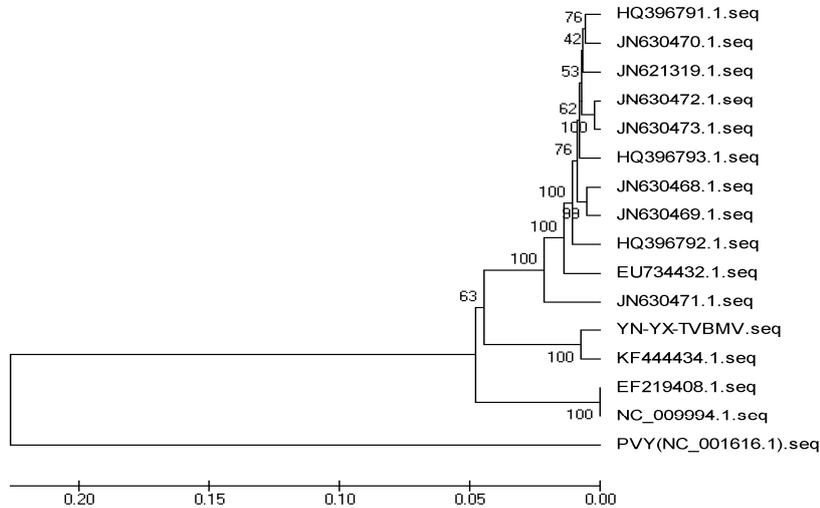


图 2 TVBMV 全基因序列系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of TVBMV complete genome sequences

### 3 讨论

本文选取袁彤彤<sup>[6]</sup>报道的 10 个 TVBMV 山东分离物, Wang 等<sup>[7]</sup>采自河南的 HN39 (EU734432.1) 分离物, Yu 等<sup>[8]</sup>采自云南的 YND (EF219408.1, NC\_009994.1) 分离物, 以及郑州烟草研究院注册的 YN9.1 分离物 (KF444434.1) 和一个 PVY 全序列 (NC-001616.1) 进行多序列对比, 并构建系统进化树。PVY 与 TVBMV 是同属不同种的病毒, 两个病毒间具有明显的进化差异<sup>[1]</sup>。采自云南的两个分离物 YND 聚为一支, 与 YND 分离物中 7 个蛋白的氨基酸序列和 ChiVMV 的相应蛋白氨基酸序列同源性最高有关<sup>[8]</sup>。YN9.1 和 YN-YX-TVBMV 聚为一支, 但和国内的其他分离物分开, 与 Zhang 等<sup>[3]</sup>的报道相同, 在其报道中, 整个中国的不同 TVBMV 分离物存在频繁的基因交流, 且云南的总是聚为一组, 组内也存在频繁基因交流。而 YN9.1 和 YN-YX-TVBMV 与 YND 差别较大; 据袁彤彤<sup>[6]</sup>研究表明, TVBMV 有强烈的地域分布性; 因此以上差异可能由 YN9.1 与 YN-YX-TVBMV 采自云南同一地区, 而

YND 与它们的采样地不同造成。

### 参考文献

- [1] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 100-106.
- [2] Y P Tian, J L Liu, X Q Yu. Molecular diversity of tobacco vein banding mosaic virus[J]. Arch Virol, 2007, 152: 1911-1915.
- [3] Cheng Ling Zhang, Rui Gao, Jie Wang. Molecular variability of Tobacco vein banding mosaic virus populations[J]. Virus Research, 2011, 158: 188-198.
- [4] 陈炯, 陈剑平. Potyvirus 属成员基因组全序列的简并引物 PCR 和 RACE 扩增方法[J]. 病毒学报, 2002, 18(4): 371-374.
- [5] 李向东, 于晓庆, 古勤生, 等. 马铃薯 Y 病毒属病毒基因功能研究进展[J]. 山东科学, 2006, 19(3): 1-6.
- [6] 袁彤彤. 烟草脉带花叶病毒山东分离物全基因组序列测定及分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012: 29-47.
- [7] H Y Wang, T S Zhu, T T Cui. Complete genome sequence of a tobacco isolate of the tobacco vein banding mosaic virus strain prevailing in China[J]. Arch Virol, 2010, 155: 293-295.
- [8] Xiao Qing Yu, Yu Fei Lan, Hong Yan Wang. The complete genomic sequence of Tobacco vein banding mosaic virus and its similarities with other potyviruses[J]. Virus Genes, 2007, 35: 801-806.