

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.03.002

四川烟区 CMV 和 PVY 株系分化研究^①

赵雪君¹, 刘世超¹, 李斌², 赵城钢¹, 刘旭旭¹,
杜丽娟¹, 魏周玲¹, 青玲¹, 陈德鑫³, 孙现超¹

1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 中国烟草总公司四川省公司, 成都 610000;
3. 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101

摘要: 为了明确当前四川烟区蚜传病毒的株系分化情况, 该研究利用 RT-PCR 技术对四川烟区的 CMV 和 PVY 两种蚜传病毒病进行了检测和鉴定. 依据病毒的 CP 基因序列合成引物, 以烟草病叶的总 RNA 为模版, RT-PCR 扩增得到了 657 bp 的 CMV CP 片段和 759 bp 的 PVY CP 片段, 获得的基因片段连接到 pGEM-T Easy 载体上, 测序. 样品检测结果显示, 在 252 份样品中 CMV 和 PVY 的检出率分别为 33.33% 和 34.52%, 两者复合感染率为 15.87%. 构建的系统发育树分析结果表明, 四川烟区的 CMV 株系分化不明显, 主要属于 IB 亚组. PVY 有着明显的株系分化现象, PVY^{N:O} 株系、PVY^O 株系、PVY^N 株系在四川烟区均有发生. 研究结果可能对培育抗病品种, 控制这两种蚜传病毒具有一定的参考价值.

关键词: 烟草植株; 黄瓜花叶病毒; 马铃薯 Y 病毒; 株系; 分化

中图分类号: S572 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2017)03-0008-09

烟草是四川省的主要经济作物之一, 全省常年种植面积达 6.67 万 hm^2 . 近些年来, 由于种植结构的一些变化, 蔬菜、花卉和果树行业迅速发展, 这些植物成为烟草病毒新的宿主植物^[1], 使得烟草病毒病的发生日益加重. CMV 和 PVY 由于其蚜传特性, 因而在烟草生产上更容易引起病毒病的流行和爆发. 黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)属于雀麦花叶病毒科 Bromoviridae, 黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus*, 可侵染 67 个科 1 000 多种植物. CMV 包括基因组 RNA1, RNA2, RNA3 和亚基因组 RNA4, RNA5, 所以 CMV 易发生变异重组. 根据血清学特征, 将 CMV 分离物分为 4 个血清型和 3 个血清组. 4 个血清型分别为 S 血清型、R 血清型、DTL 血清型、To 血清型. 3 个血清组分别为 Co 血清组、ToRS 血清组、DTL 血清组^[2]. 其中, 血清组 DTL 为亚组 I, 血清组 ToRS 为亚组 II. 在亚组 I 内根据 CMV RNA3 的 5' 端, 非编码区序列的比对结果, 亚组 I 又可以进一步分为 IA 和 IB, 并且推测, RNA3 的 5' 端的非编码区的序列发生重排、插入、删除可能导致了 CMV 不同亚组的出现^[3].

马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)属于马铃薯 Y 病毒科 Potyviridae 马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*. PVY 分离物可以分为 2 个血清型, PVY^{O:C} 血清型和 PVY^N 血清型. PVY^{O:C} 血清型包括 PVY^O, PVY^C, PVY^Z, PVY^{N:O}. PVY^N 血清型(以后称之为 PVY^{N/NTN}), 包括 PVY^N 和 PVY^{NTN}^[4-5]. 根据寄主的症状和蚜传特性, PVY 可以划分为 3 个株系, 分别为普通株系、脉坏死株系、点条纹株系. 普通株系(PVY^O) 在马铃薯

① 收稿日期: 2015-07-07

基金项目: 中国烟草总公司四川省公司科技项目(201202007); 国家自然科学基金(30900937).

作者简介: 赵雪君(1990-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究.

通信作者: 孙现超, 博士, 研究员.

薯上引起皱缩或条纹落叶病,在烟草上则引起系统斑驳症状;脉坏死株系(PVY^N)在马铃薯上引起轻微的斑驳症状,在烟草上则引起严重的系统脉坏死症状;点条纹株系(PVY^C)在马铃薯一些品种上引起过敏反应,在另一些品种上引起花叶症状,而在烟草上则引起系统斑驳症状^[6]。近些年来,在欧洲和美洲地区出现了一些新的 PVY 株系,例如 PVY^{N:O},PVY^{NW},PVY^{NTN},PVY^{NA-NTN},这些株系都是 PVY^O 和 PVY^N 重组或突变而成的株系^[7]。PVY Wilga 最早是从波兰 Wilga 这个品种中分离得到的,之后被称为 PVY^{N:O} 株系^[8]。PVY 的各种新株系致病力更强,并且因蚜虫传播迅速扩散。

到目前为止, RNA 病毒是植物中最常见的病毒^[9]。病毒在自然界中会由于内外因素的影响发生重组和变异,将导致新毒株、新株系,甚至是新种类出现。序列分析已经成为研究病毒演化最重要的工具之一。由于 CMV 和 PVY 都是 RNA 病毒并且可以通过蚜虫传播,所以它们在自然条件下很容易远距离传播并发生突变和重组而形成致病力不同的新株系。本研究利用 RT-PCR 对四川省 14 个县、市, 252 份烟草样品的 CMV 和 PVY 病毒进行病害检测和株系鉴定,以期进一步了解四川烟草上 CMV 和 PVY 病毒的株系情况。

1 材料与方法

1.1 材料

从四川省 4 个烟区采集 252 份烟草病毒样品。采集地为四川省广元市(张帽 ZM、普安 PA、元坝 YB),达州市(天龙 TL、红岩坝 HYB、沙坝 SB),西昌市(德昌 DC、宁南 NN、普基 PJ、喜德 XD、盐源 YY),攀枝花市(米易 MY、仁和 RH、盐边 YBb)。

植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自天根科技有限公司,大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司,载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司,其他生物学试剂均购自 TaKaRa 公司。

1.2 样品总 RNA 提取

病叶和健康烟叶总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒,具体方法如下:①管中加入 500 μ L RLT 和 50 μ L PLANTaid 备用;②称取叶片 0.1~0.2 g,液氮研磨至细粉转移至管中,56 $^{\circ}$ C 水浴 3 min,13 000 r/min,离心 10 min;③上清转移至新管,加入 0.5 体积的无水乙醇(一般为 250~225 μ L),13 000 r/min,离心 2 min,弃废液;④加 700 μ L RW1,13 000 r/min,离心 30 s,弃废液;⑤加 500 μ L RW,12 000 r/min,离心 30 s,弃废液,重复 1 次;⑥吸附柱放入收集管,13 000 r/min,离心 2 min,弃废液;⑦将吸附柱放入新管,加入 30~50 μ L RNase free water,1 200 r/min,离心 1 min,弃吸附柱,收集样品 RNA。

1.3 引物的设计与合成

PCR 引物根据 GenBank 上发表的 CMV CP,PVY CP 基因序列分别设计 3 对引物,由华大基因公司合成,经特异性检测确定最佳引物对(表 1)。

表 1 本研究用到的引物

引物名称	引物序列 5'-3'
CMV-R	GAGCTCTCAAACCTGGGAGCACCCCTGA
CMV-F	GCGGATCCATGGACAAATCTGAATCAAC
PVY-R	GCGCGGTACCTCACATGTTCTTGACTCCAAGT
PVY-F	GCGCGGATCCGCAAATGACACAATGGCATGCAG

1.4 RT-PCR 检测

以提取的总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA 的第 1 条链,在 10 μ L 的反应体系中加入 RNase Free ddH₂O 4.0 μ L,5 \times Prime Script Buffer 2.0 μ L,Oligo dT Primer 0.5 μ L,Random 6 mers 0.5 μ L,Prime Script RT Enzyme Mix 0.5 μ L, RNA 提取物 2.5 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,85 $^{\circ}$ C 反应 20 s。

PCR 扩增,以 1.0 μ L DNA 为模板,在 25 μ L 的反应体系中加入 10 \times Reaction buffer 2.5 μ L,rTaq

DNA聚合酶0.3 μL (1 U), 10 mmol/d NTPs 0.5 μL , 上、下游引物各0.5 μL , 剩余以灭菌 ddH₂O 补足. 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 110 s, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时间为 10 min. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在 110 V 下电泳 25 min, 经 Goldview 染色后观察电泳结果并拍照.

1.5 克隆、测序及序列分析

回收 RT-PCR 产物, 与载体 pGEM-T Easy Vector 连接, 转化到 *E. coli* DH5 α . 克隆经过 PCR 鉴定呈阳性的菌液, 由华大基因公司负责序列测定. 对所得的核苷酸序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 并且用 MEGA5(<http://www.megasoftware.net/>)、DNAMAN 和 DNASTar 软件分析所得的序列, 从 NCBI 上选取各株系的代表序列(表 2, 表 3)与所得的序列进行核苷酸、氨基酸同源性比较, 构建系统发育树. 其中烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV, No. AF012917.1)作为外群对照.

表 2 来自不同国家和地区作物上的 CMV 分离物

序列号	分离物	国家	寄主植物	序列号	分离物	国家	寄主植物
AJ810253.1	RT67	荷兰	莴苣	JF918964.1	N1-05	美国	长春花
AJ810254.1	RT68	荷兰	菠菜	JQ074219.1	ISPaVe05	意大利	番茄
AJ810256.1	PV0418	美国	—	AJ810258.1	RT52	美国	南瓜
U10923.1	SP103	美国	菠菜	JQ013954.1	Gera-EG	埃及	天竺葵
AB006813	m2	日本	—	EF153739.1	—	印度	麻疯树
L40953.1	CMV-Wem	—	—	AJ810261.1	CN03	中国	红辣椒
AJ585086	—	印度	百合	X89652	pCP25	印度	小酸浆
DQ002876.1	DI1	伊朗	葫芦	AF350450	—	印度	黑莨菪
AB448692.1	ToCMV5-2	叙利亚	烟草	AF281864	—	印度	曼陀罗

表 3 来自不同国家和地区作物上的 PVY 分离物

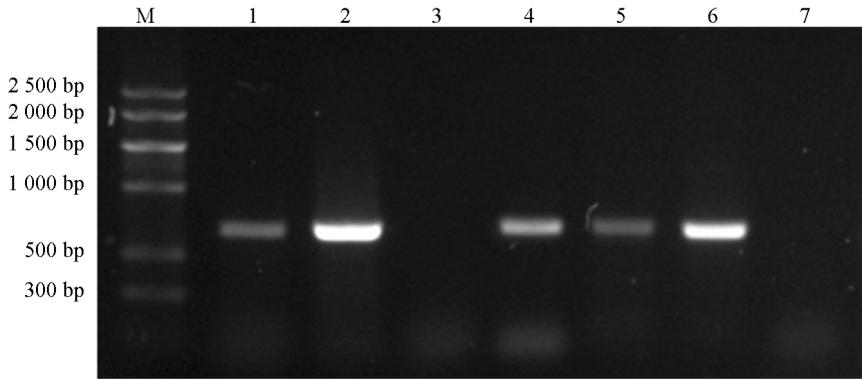
序列号	分离物	国家	寄主植物	序列号	分离物	国家	寄主植物
AB295475.1	SYR-Sn	叙利亚	龙葵	AJ585197.1	SCRI-N	英国	马铃薯
JN635310.1	GY.1	中国宁夏	马铃薯	AY166867.1	N-Jg	加拿大	—
KC506396.1	YuN16	中国云南	马铃薯	U09509.1	PVYO139	加拿大	马铃薯
KC506386.1	CQ	中国重庆	马铃薯	AJ585195.1	SASA-110	英国	马铃薯
KC506392.1	NMG13	中国内蒙古	马铃薯	AJ890349.1	LW	波兰	马铃薯
AY061994.1	—	印度	—	AJ585196.1	SCRI-O	英国	马铃薯
AB295476.1	PVY-12/4	叙利亚	马铃薯	EF026074.1	PVY-Oz	美国	马铃薯
AB295478.1	SYR-D9	叙利亚	马铃薯	DQ157178.1	ID-1	美国	—
EU161658.1	v0619802	英国	—	AY884985.1	Alt	美国	—
AJ133454.1	—	—	矮牵牛花	DQ157179.1	OR-1	美国	—
KF933392.1	T5. NTN	伊朗	番茄	EF026076.1	PB209	美国	马铃薯
GQ853667.1	CC24_5	南非	马铃薯	GQ200836	HN2	中国	马铃薯
AY319647.1	—	德国	—	AY745491	N: O-Mb112	加拿大	—
GQ853666.1	TT138E-111-104	南非	马铃薯	AJ890348.1	Adgen	法国	马铃薯
AY884983.1	Mont	美国	—	AF012028.1	—	西班牙	—
X97895.1	N605	瑞士	—	AF012029.1	—	西班牙	—

2 结果与分析

2.1 烟草样品的 RT-PCR 检测

2.1.1 CMV CP 基因 RT-PCR 检测

以采集样品烟草叶片总 RNA 的反转录产物为模版,利用引物 CMV-R 和 CMV-F 进行 PCR 扩增,PCR 产物经过 1% 的凝胶琼脂电泳,可得到大小约 657 bp 的条带,与预期目标片段大小相符,测序结果证实为 CMV CP 序列,而从健康烟叶中未扩增出特异性条带(图 1),表明本研究设计的 CMV CP 特异性引物及建立的检测体系可以用于样品检测。

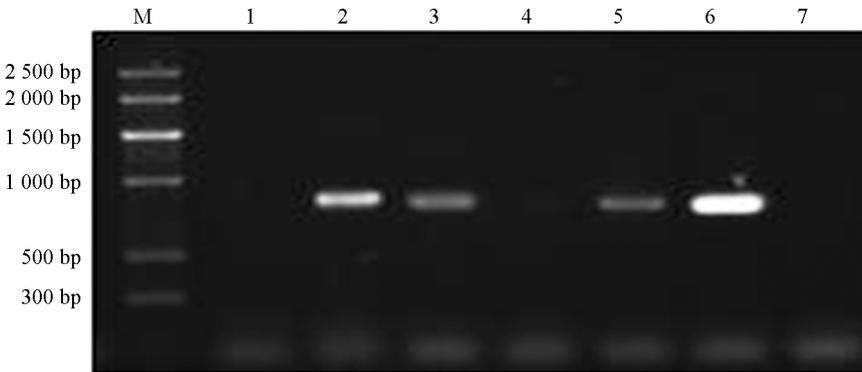


M: Bio Marker V 1-5: 烟草样品; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照.

图 1 CMV CP 的 RT-PCR 产物电泳结果

2.1.2 PVY CP 基因 RT-PCR 检测

以采集样品烟草叶片总 RNA 的反转录产物为模版,利用引物 PVY-R 和 PVY-F 进行 PCR 扩增,PCR 产物经过 1% 的凝胶琼脂电泳,可得到大小约 759 bp 的条带,与预期目标片段大小相符,测序结果证实为 PVY CP 序列,而从健康烟叶中未扩增出特异性条带(图 2),表明本研究设计的 PVY CP 特异性引物及建立的检测体系可以用于样品检测。



M: Bio Marker V 1-5: 烟草样品; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照.

图 2 PVY CP 的 RT-PCR 产物电泳结果

2.2 田间样品病毒种类的统计与分析

对四川广元市、达州市、西昌市、攀枝花市 4 个烟区 CMV 和 PVY 的发生情况进行调查,结果显示,在 252 份样品中 CMV 占 84 例,约为 33.33%,PVY 占 87 例,约为 34.52%,两者复合侵染 40 例,约为 15.87%。其中,达州地区病毒病的发生情况最为严重,CMV 的发病率为 66.67%,PVY 为 80%,两者复合侵染率超过了 50%。相比之下,攀枝花的发病情况较轻,CMV 为 23.53%,PVY 为 17.65%,两者复合侵染率也最低,仅为 5.88%(表 4)。

表 4 田间样品检测结果

样品来源	样品编码	样品数	CMV	比例/%	PVY	比例/%	CMV+PVY	比例/%
广元	ZM	9	3	25.00	6	50.00	0	25.00
	PA	6	0		0		0	
	YB	9	3		6		6	
达州	TL	18	3	66.67	15	80.00	1	53.33
	HYB	12	12		6		6	
	SB	15	15		15		15	
西昌	DC	13	3	29.63	0	25.93	0	7.40
	NN	15	6		0		0	
	YY	27	0		15		0	
	DX	12	6		6		6	
	PJ	15	9		0		0	
攀枝花	MY	15	0	23.53	12	17.65	0	5.88
	YBb	48	12		6		6	
	RH	39	12		0		0	
合计		252	84	33.33	87	34.52	40	15.87

2.3 CP 的序列分析

2.3.1 CMV CP 的序列分析

随机选不同地区样品中的 CMV CP 克隆进行测序, 结果表明 SB2, SB3, SB4, YB6, ZM5, HYB1, HYB6, XD4, PJ4, PJ9, PJ11, NN4, TL5 这些四川 CMV 分离物的 CP 基因序列长度均为 657 个核苷酸, 编码 219 个氨基酸. 所得序列上传至 GenBank 获得登录号分别为 KJ746019, KJ746020, KJ746021, KJ746022, KJ746023, KJ746014, KJ746013, KJ746015, KJ746012, KJ746011, KJ746018, KJ746016, KM875631. 四川 CMV 分离物间 CP 基因核苷酸序列的同源性为 94.5%~99.5%, 氨基酸的同源性为 96.3%~99.8%, 氨基酸序列的同源性比核苷酸序列的同源性略高. 四川 CMV 分离物与各代表株系进行核苷酸同源性比较, 结果显示 CMV 四川分离物与 II 组分离物核苷酸序列的同源性仅为 74.9%~78.8%, 与 IA 亚组核苷酸序列的同源性为 91.9%~94.1%, 与 IB 亚组核苷酸序列的同源性为 93.6%~97.6%. 表明四川 CMV 分离物与 IB 亚组的同源性关系密切, 结合系统发育树可以看出(图 3), 四川 CMV 分离物应该归属于 CMV IB 亚组.

2.3.2 PVY CP 的序列分析

随机选不同地区样品中的 PVY CP 克隆进行测序, 结果表明 TL2, TL3, TL4, TL5, TL6, HYB2, HYB7, SB1, SB2, SB3, SB4, SB6, ZM3, ZM6, YB6, YY8, YY10, XD3 这些四川 PVY 分离物的 CP 基因序列长度均为 759 个核苷酸, 共编码 253 个氨基酸. 所得序列上传至 GenBank 获得登录号分别为 KJ599652, KJ599653, KJ605679, KJ605680, KJ605681, KJ599650, KJ599651, KJ868845, KJ868847, KJ543496, KJ868846, KJ868848, KJ634690, KJ634691, KJ634694, KJ634692, KJ634693, KJ746017. 四川 PVY 分离物与各代表株系进行核苷酸同源性比较, 分离物 TL2, TL4, ZM3, ZM6, YY8, YY10, XD4, SB3 与 PVY^{N₁O}, PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN}株系的核苷酸同源性分别为 99.1%~99.6%, 94.4%~99.2%, 87.5%~89.7%, 88.9%~91.6%. 分离物 HYB2, HYB7, SB1, SB2, SB4, SB6, YB6 与 PVY^{N₁O}, PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN}株系的核苷酸同源性分别为 97.2%~98.7%, 97.4%~99.5%, 87.5%~89.9%, 89.1%~91.6%. 分离物 TL3,

TL5, TL6 与 PVY^{N:O}, PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN} 株系的核苷酸同源性分别为 87.6%~88.1%, 87.0%~88.0%, 93.3%~98.7%, 为 93.0%~94.7%。结合系统发育树可以看出(图 4), 四川 PVY 分离物 TL2, TL4, ZM3, ZM6, YY8, YY10, XD4, SB3 属于 PVY^{N:O} 株系, 分离物 HYB2, HYB7, SB1, SB2, SB4, SB6, YB6 属于 PVY^O 株系, 分离物 TL3, TL5, TL6 属于 PVY^N 株系。

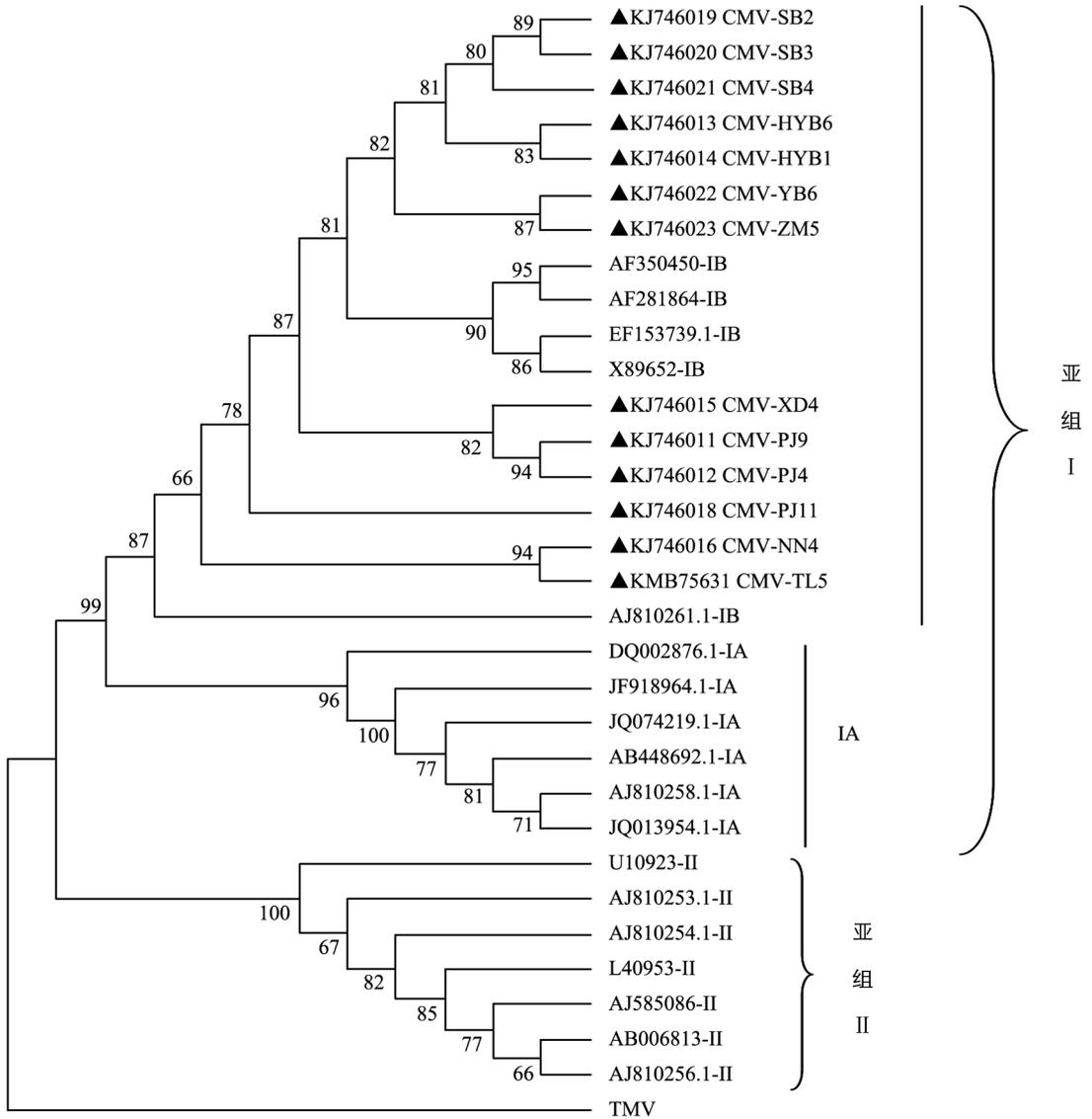


图 3 基于 CMV CP 序列构建的系统发育树

3 讨论

CMV 亚组划分的依据主要是根据核酸组成、衣壳蛋白肽链图谱、核苷酸序列、血清学反应来划分。迄今为止, CMV 基本上可以分为 3 个亚组, 分别为亚组 IA、亚组 IB 和亚组 II。我国已经报道的 38 个科 120 多种植物上分离得到的 CMV, 除了厦门报道的芭蕉和西番莲上面发现的 CMV 分离物为亚组 II 外, 其他 CMV 分离物多为亚组 I, 这说明 CMV 亚组 II 在我国很少发生^[10]。李凡等^[11]2000 年首次在烟草上面发现 CMV 亚组 II 分离物。本研究对四川烟区烟草上的 CMV 分离物的 CP 基因进行了克隆测序并构建系统发育树, 结果显示四川 CMV 分离物主要和来自印度和中国的 IB 亚组聚集在一大支, 在进化上表现出一定的地域相关性, 四川 CMV 分离物均属于 IB 亚组, 并且与已报道的杂草及药用植物上的 CMV 分离物关系较近, 可以推测烟草周围杂草及其他作物上的 CMV 可能是烟田 CMV 的主要毒源。从系统发

育树可见, CMV 主要聚集为两组, 一组为广元和达州地区, 一组为西昌地区. 从地理位置上看, 广元和达州地区主要分布在四川省的东北方向, 且两个地区相近, 而西昌则在西南方向, 由此得出四川 CMV 分离物有一定的地域差异性. 鉴于烟草上面主要以 CMV 亚组 I 的危害为主, 所以烟草的抗病育种应该以亚组 I 分离物为主.

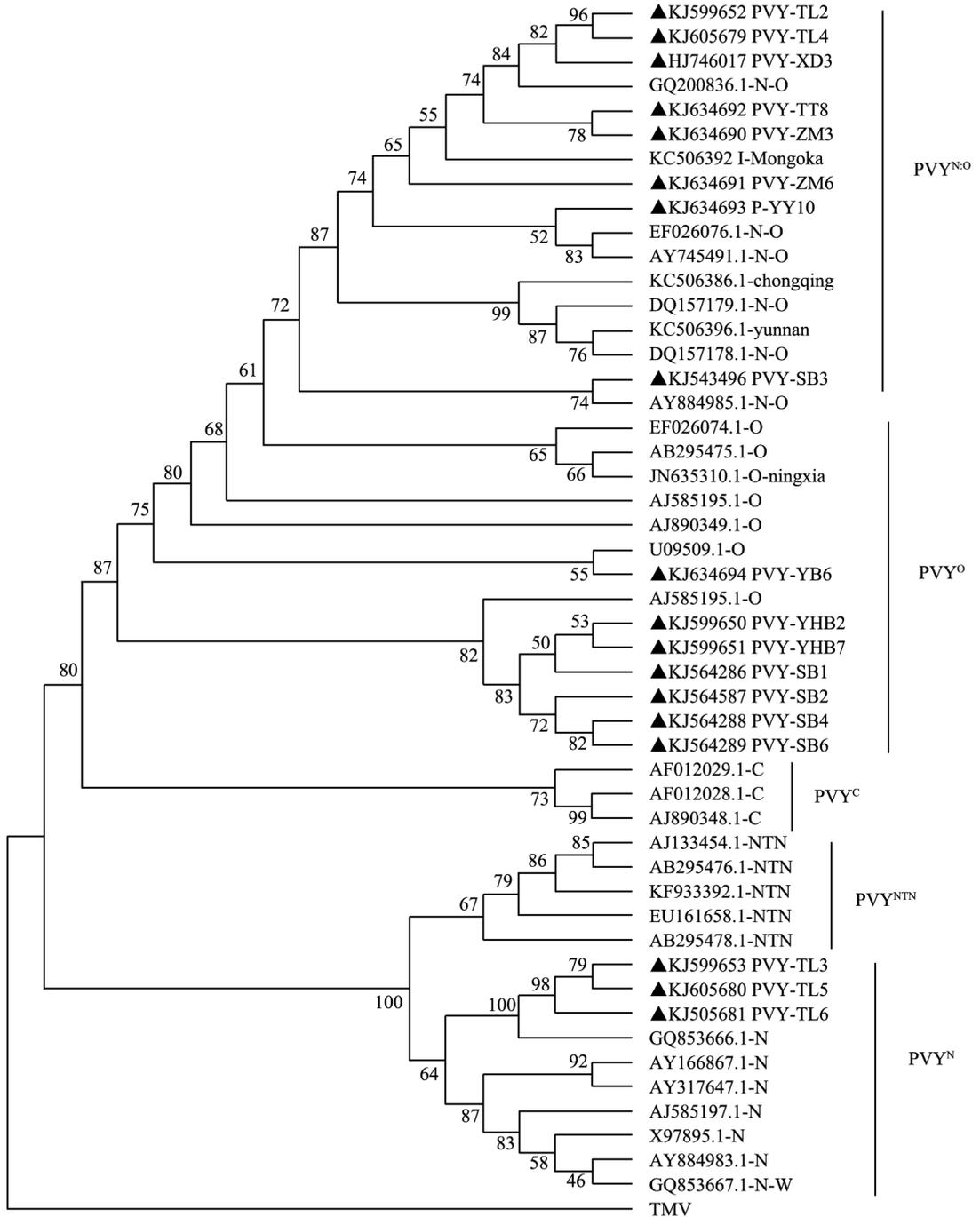


图 4 基于 PVY CP 序列构建的系统发育树

开展 PVY 株系鉴定具有重要的理论及实践意义^[10]. 本研究 PVY 系统发育树显示, PVY 可以分为两支, 支点 I 包括 PVY^O, PVY^{N:O} 和 PVY^C, 支点 II 包括 PVY^{NTN} 和 PVY^N. 四川 PVY 分离物与中国重庆、云南、宁夏、内蒙古这些地方的 PVY 分离物同源性很近. 目前, 我国在分子水平上对 PVY 株系已经开始研究. 王秀芳等^[12] 研究证明了山东 PVY 分离物属于 PVY^O 株系. 石鹏君等^[13] 克隆并且表达了 PVY^N 和 PVY^O 株系的 HC-Pro 基因. 陈士华等^[14] 研究表明, 黑龙江 PVY 分离物为 PVY^{NTN} 株

系, 贵州贵阳、山西临县分离物为 PVY^{N₁O} 株系. 吴志明等^[15]对河北 PVY 分离物进行鉴定, 判断其为 PVY^O 株系. 核苷酸同源性比对结果并结合系统发育树可以看出, 四川烟区 PVY 有着明显的株系分化现象, PVY^{N₁O} 株系、PVY^O 株系、PVY^N 株系均有发生, PVY^{N₁O} 是四川烟草上面的优势种群, 这也是全球各地流行的 PVY 重组株系之一^[16]. 四川 PVY 分离物显示出一定的地域差异, 不同烟区采集的 PVY 在系统发育树上分属不同的支点. 在 PVY^{N₁O} 株系中, 西昌分离物 YY10 与美国分离物 PB209 和加拿大分离物 N: O-Mb112 的亲缘关系较近, 达州分离物 SB3 与美国分离物 Alt 亲缘关系较近. 在 PVY^O 株系中, 广元分离物 YB6 与加拿大分离物 PVYO139 的亲缘关系较近, 而达州分离物 HYB2, HYB7, SB1, SB2, SB4, SB6 聚集为一支, 并且与英国分离物 SASA-110 的亲缘关系较近. 在 PVY^N 株系中, 达州分离物 TL3, TL5, TL6 与南非分离物 TT138E-111-104 处于一支, 亲缘关系较近. 四川烟区 PVY 株系的多样化给防治 PVY 引起的病毒病带来了一定的困难. 不同株系在蚜虫传毒效率方面是否有一定的差异, 值得进一步深入研究.

参考文献:

- [1] 汪莹, 夏先全, 杨建, 等. 四川烟草病毒病毒源植物检测及分析 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2217—2219.
- [2] DEVERGNE J C, CARDIN L. Serological Relations Between Cucumis Viruses (CMV, TAV, PSV). Relations Serologiques Entre Cucumovirus (CMV, TAV, PSV) [J]. Annales de Phytopathol, 1975(7): 255—276.
- [3] ROOSSINCK M J, ZHANG L, HELLWALD K H. Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber *Cucumber mosaic virus* RNA3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups [J]. Journal of Virology, 1999, 73(8): 6752—6758.
- [4] BLANCO-URGOITI B, TRIDOBET M, LECLERE S, et al. Characterization of Potato Potyvirus (PVY) Isolates from Seed Potato Batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates [J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104(8): 811—819.
- [5] CHRZANOWSKA M, DOROSZEWSKA T. Comparison Between PVY Isolates Obtained from Potato and Tobacco Plants Grown in Poland [J]. Phytopathology, 1997(13): 63—71.
- [6] BOONHAM N, WALSH K, PRESTON S, et al. The Detection of Tuber Necrotic Isolates of *Potato virus Y* and the Accurate Discrimination of PVY^O, PVY^N and PVY^C Strains Using RT-PCR [J]. Journal of Virological Method, 2002, 2(10): 103—112.
- [7] GLAIS L, TRIBODET M, KERLAN C. Genomic Variability in Potato Potyvirus (PVY): Evidence That PVY^{NW} and PVY^{NTN} Variants Are Single to Multiple Recombinants Between PVY^O and PVY^N Isolates [J]. Archives of Virology, 2002, 147(2): 363—378.
- [8] CHRZANOWSKA M. New Isolates of the Necrotic Strain of Potato Virus Y (PVYN) Found Recently in Poland [J]. Potato Research, 1991, 34(2): 179—182.
- [9] HULL R. Matthews' Plant Virology [M]. San Diego: Academic Press, 2002.
- [10] 徐平东, 林奇英. 黄瓜花叶病毒两亚组分离物寄主反应和血清学性质比较研究 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 353—360.
- [11] 李凡, 周雪平, 戚益军, 等. 从云南烟草上检测到的黄瓜花叶病毒亚组 II 分离物 [J]. 微生物学报, 2000, 40(4): 346—351.
- [12] 王秀芳, 朱常香, 温孚江, 等. 一个马铃薯 Y 病毒山东分离物的分离与鉴定 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 203—208.
- [13] 石鹏君. 马铃薯 Y 病毒 Hc-Pro 和甘蔗花叶病毒 CP 基因的克隆原核表达与抗血清制备 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [14] 陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 等. 中国部分马铃薯产物马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的株系分化与鉴定 [J]. 河南农业大学学报,

2011(05): 548-551.

- [15] 吴志明,董志茹,刘小娟,等. 马铃薯Y病毒河北分离物外壳蛋白基因序列分析和株系鉴定 [J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 324-326.
- [16] QUENOUILLE J, VASSILAKOS N, MOURY B B. *Potato virus Y*: a Major Crop Pathogen That Has Provided Major Insights Into the Evolution of Viral Pathogenicity [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(5): 439-452.

Study on Strain Differentiation of CMV and PVY in the Main Tobacco-Planting Areas in Sichuan Province

ZHAO Xue-jun¹, LIU Shi-chao¹, LI Bin²,
ZHAO Cheng-gang¹, LIU Xu-xu¹, DU Li-juan¹,
WEI Zhou-ling¹, QING Ling¹, CHEN De-xin³, SUN Xian-chao¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing, 400716, China;

2. Sichuan Province Tobacco Monopoly Administration, Chengdu 610000, China;

3. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao Shandong 266101, China

Abstract: In order to investigate strain differentiation of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Potato virus Y* (PVY) in the main tobacco-planting areas in Sichuan, and provide helpful reference for controlling these two aphid-transmitted virus diseases in the province by anti-virus tobacco cultivar breeding, RT-PCR was performed for their detection and identification. Specific primers were designed and synthesized based on the nucleotide sequence of CP. The target fragments about 657 bp of CMV CP and 759 bp of PVY CP were amplified by RT-PCR from the RNA template of the infected samples. The amplified cDNA fragments were then cloned into pGEM-T Easy Vector and sequenced. Of the 252 tobacco samples collected, 33.33% and 34.52% were infected by CMV and PVY, respectively, and 15.87% samples were co-infected by both viruses. A phylogenetic tree analysis of the CP nucleotide sequences showed that there was no obvious differentiation among CMV isolates in Sichuan province, all the CMV isolates belonging to the CMV IB subgroup, while the differentiation of PVY strains of Sichuan was obvious and three PVY stains (PVYN:O, PVYO and PVYN) were detected.

Key words: tobacco plants; *Cucumber mosaic virus* (CMV); *Potato virus Y* (PVY); strain; differentiation

责任编辑 夏娟

