

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.02.005

烟草扭脉病毒云南分离物 *rtp* 基因克隆及序列分析

杨亚辉, 杨洁, 陈平, 陈海如, 陈小姣, 李凡

云南农业大学 植物保护学院, 昆明 650201

摘要: 探究来自云南不同时间和不同地区的烟草扭脉病毒(TVDV)各分离物间 *rtp* 基因序列差异, 分析烟草丛顶病近年在田间发生趋势减缓的原因. 以 2020—2022 年从云南楚雄、大理、保山及红河采集的染病烟草样品为材料, 对 TVDV 的 *rtp* 基因进行扩增和序列分析, 共得到 TVDV 7 个不同分离物的 *rtp* 基因序列, 长度均为 2 172 nt, 包含 618 nt 的 *cp* 基因及 1 554 nt 的 *rtd* 区; 推导的 TVDVRTP 蛋白共编码 722 个氨基酸, 其中包含 CP 蛋白的 205 个氨基酸, RTD 的 517 个氨基酸. 多重序列比对结果发现, 获得的 7 个 TVDV 分离物与 GenBank 上登录的其他 TVDV 分离物间 *cp* 基因核苷酸序列一致性为 98.71%~100%, 不同 TVDV 分离物间 CP 蛋白的氨基酸序列一致性为 98.05%~100%, 存在 4 个氨基酸的差异. 获得的 7 个 TVDV 分离物与 GenBank 数据库登录的其他 TVDV 分离物间 *rtd* 区核苷酸序列一致性为 96.68%~99.81%, RTD 蛋白的氨基酸序列一致性为 96.52%~100%, 存在 39 个氨基酸的差异. 这些 TVDV 分离物 *rtp* 基因的变异可能会对 TVDV 的蚜虫传播效率产生影响, 进而影响到烟草丛顶病在田间的发生与流行.

关键词: 烟草扭脉病毒; 烟草丛顶病;

通读蛋白; 分子变异; 蚜虫传播

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)02-0038-11

Cloning and Sequencing Analysis of the Readthrough Protein Gene of Different Tobacco Vein Distorting Virus Isolates of Yunnan Province

YANG Yahui, YANG Jie, CHEN Ping,
CHEN Hairu, CHEN Xiaojiao, LI Fan

College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

收稿日期: 2023-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(31960532); 云南省院士专家工作站(202005AF150040).

作者简介: 杨亚辉, 硕士, 主要从事植物病毒学研究.

通信作者: 陈小姣, 副教授.

共同通信作者: 李凡, 教授.

Abstract: In order to explore the variations in the readthrough protein gene (*rtp* gene) sequence among isolates of tobacco vein distorting virus (TVDV) collected at different times and from various regions of Yunnan Province, and analyze the factors contributing to the recent deceleration of tobacco bushy top disease in the field, the *rtp* gene sequences of TVDV were cloned and analyzed from the diseased tobacco samples collected from Chuxiong, Dali, Baoshan and Honghe Autonomous Prefectures/City in Yunnan Province from 2020 to 2022. The *rtp* gene sequences of seven different TVDV isolates were obtained, all of them were 2 172 nucleotide (nt) in length, consisting of a 618-nt CP gene and 1 554-nt RTD domain. Consequently, the TVDV RTP protein has a total of 722 amino acids (aa), comprising 205 aa of CP protein and 517 aa of RTD. Multiple alignment analysis results showed that the nt sequence identities of the *cp* gene between the seven TVDV isolates obtained in this study and the TVDV isolates registered in GenBank were 98.71%~100%. Similarly, the aa sequence identities of the CP protein among different TVDV isolates were 98.05%~100%, with four aa variations. The nt sequence identities of the RTD domain between the seven TVDV isolates obtained in this study and the TVDV isolates derived from GenBank ranged from 96.68% to 99.81%. Likewise, the aa sequence identities of their RTD domain were 96.52%~100%, with thirty-nine aa differences. The variation of *rtp* gene in these TVDV isolates may affect the efficiency of aphid transmission of TVDV, and thus affect the occurrence and prevalence of tobacco bushy top disease in the field.

Key words: tobacco vein distorting virus; tobacco bushy top disease; readthrough protein; molecular variation; aphid transmission

烟草扭脉病毒(Tobacco vein distorting virus, TVDV)是引起烟草丛顶病的主要病原物之一^[1],主要由蚜虫进行传播,单独侵染烟草时无明显症状,与病原物烟草丛顶病毒(Tobacco bushy top virus, TBTV)^[2],烟草丛顶病毒卫星RNA(Tobacco bushy top virus satellite RNA, TBTVsatRNA)^[3]和烟草扭脉病毒伴随RNA(Tobacco vein distorting virus associated RNA, TVDVaRNA)^[4]共同侵染引起烟草丛顶病^[5],仅在4种病原物同时存在时才会显现烟草丛顶病的典型症状^[6].在中国,烟草丛顶病1993年首次在云南省保山市大面积暴发,随后发生地主要集中在云南省的保山市、大理州和楚雄州,另外昆明、玉溪、红河、思茅、文山、西双版纳及怒江等州(市)也有烟草丛顶病零星发生的报道.截至2001年,烟草丛顶病在云南累计发病面积达51 300 hm²,其中8 700 hm²的烟草绝收,直接经济损失高达2.1亿元^[7],但近年来烟草丛顶病的发生在逐渐减少,具体原因尚不清楚.烟草丛顶病主要依靠蚜虫为媒介进行传播,TVDV是蚜虫传播烟草丛顶病的关键因子^[8],可以辅助其余3种病原物进行蚜虫传播.

TVDV属于马铃薯卷叶病毒属病毒(*Potyvirus*),TVDV基因组为单分体线性正义单链RNA病毒(+ssRNA),全长5 920 nt^[1].TVDV的基因组结构包含7个ORFs,其中,ORF3编码22.4 kDa的蛋白,为病毒的外壳蛋白(Coat Protein, CP);ORF5称为通读域(Readthrough Domain, RTD),与ORF3的终止密码子相连接形成ORF3-RTD的编码框,编码大小为79.3 kDa的通读蛋白(Read through protein, RTP)^[9].马铃薯卷叶病毒属病毒的CP具有较高的同源性,RTD蛋白分为N端保守区和C端可变区,可变区的序列差异较大^[10].TVDV通过蚜虫以持久非增殖型的方式进行传播,不能通过汁液机械传播^[11],持久性病毒通过蚜虫传播,需要突破蚜虫的肠道和唾液腺两道屏障才能顺利进行传播,通过借助结构蛋白介导的胞吞胞吐机制进行传播^[12].TVDV主要通过RTP与蚜虫相关蛋白的相互识别进行传播,有研究通过对同属的甜菜西方黄化病毒(Beet western yellows virus, BWYV)CP蛋白进行体外表达、突变体构

建及电镜、荧光显微镜检测发现, BWYV 可通过 CP 蛋白介导的胞吞胞吐机制突破肠道屏障^[13], 说明 CP 是病毒突破蚜虫屏障的必需蛋白. 另外, 在对 BWYV 与南瓜蚜传黄化病毒(Cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV)RTD 区的置换试验中发现, RTD 区在对蚜虫肠道的侵入位点识别及能否突破蚜虫唾液腺屏障具有决定性作用^[14]. 以上结果表明, 构成马铃薯卷叶病毒属病毒 RTP 的 CP 和 RTD 对该属病毒顺利突破传毒昆虫的屏障进行有效传播具有重要意义. 且有研究表明, 马铃薯卷叶病毒属病毒的 RTD 保守区域参与了病毒在植物宿主中的移动和积累^[15-16]. 综上所述, 马铃薯卷叶病毒属病毒 RTP(包含 CP 和 RTD)对顺利完成病毒对植物的侵染以及经昆虫介体传播具有十分重要的作用. 本研究通过扩增和分析不同年份来自云南省不同烟区的 TVDV 分离物 *rtp* 基因的核苷酸序列及其编码产物的氨基酸序列, 探讨不同 TVDV 分离物的变异特性对其侵染植物和昆虫介体传播的影响, 为 TVDV 的防控提供重要参考, 同时也可进一步为防治烟草丛顶病的发生提供参考.

1 材料与方法

1.1 样品来源

2020—2022 年, 从云南省保山市、楚雄州、大理州以及红河州采集的烟草病毒病样品(表 1). 经 RT-PCR 检测后, 每个地区选择一个含 TVDV 的烟草样品进行 TVDV *rtp* 基因序列的扩增和序列分析.

表 1 样品信息表

名称	样品采集地	采集时间	样品数量/个
20YCX	楚雄州楚雄市	2020 年 6 月	8
21YCX	楚雄州楚雄市	2021 年 6 月	22
20YDLWS	大理州巍山县	2020 年 6 月	8
21YDLWS	大理州巍山县	2021 年 6 月	22
20YLY	保山市隆阳区	2020 年 6 月	50
21YLY	保山市隆阳区	2021 年 6 月	26
22YLY	红河州泸西县	2022 年 7 月	42

1.2 烟草样品总核酸的提取

利用 CTAB 法^[17]提取烟草样品的总核酸: 称取样品叶片 0.1 g, 立即加入 1.2 mL 含 2% 巯基乙醇 CTAB 缓冲液, 于高通量组织研磨仪中研磨充分后, 置于 65 °C 水浴锅中保温 50 min; 4 °C, 12 000 rpm 离心 10 min, 取上清液至新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24 : 1), 充分振荡混匀; 4 °C, 12 000 rpm 离心 10 min, 转移上清液至新的 1.5 mL 离心管中并加入预冷异丙醇(上清 : 异丙醇 = 1 : 0.7), 反复颠倒数次, 室温放置 10 min; 4 °C, 12 000 rpm 离心 15 min, 丢弃上清, 沉淀加入预冷的 75% 乙醇 500 μ L, 12 000 rpm 离心 10 min, 丢弃上清, 室温下自然干燥 15 min; 待核酸沉淀干燥后, 加入 30 μ L ddH₂O 后并置于冰上 30 min 进行充分溶解, 提取的核酸保存于 -20 °C 冰箱, 用于后续试验.

1.3 引物设计

据 NCBI 数据库中 TVDV-YKMPL 分离物(登录号: MW579561)的序列, 设计扩增 TVDV *rtp* 基因的引物(表 2), *rtp* 基因全长 2 712 nt, 共设计了 3 对引物分成 3 个片段进行扩增, *rtp* 片段 1 与 *rtp* 片段 2 之间有 120 nt 的重叠区, *rtp* 片段 2 与 *rtp* 片段 3 之间有 57 nt 的重叠区.

1.4 RT-PCR 扩增

反转录体系(10 μ L)包括:模板核酸 2 μ L,通用引物 1 μ L, ddH₂O 3 μ L, 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰上急冷 2 min 后,加入试剂 5 $\times$ M-MLV Buffer 2 μ L、dNTP mixture(10 mmol/L)和 RNase M-MLV(RNaseH-, 200 U/ μ L)各 0.5 μ L, ddH₂O 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 保温 60 min,再 70 $^{\circ}$ C 保温 15 min.

PCR 扩增体系(10 μ L): Taq mix 5 μ L, ddH₂O 3.6 μ L, 特异性上下游引物(表 2)各 0.2 μ L, cDNA 1 μ L. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 根据表 2 中引物所对应的退火温度退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min. PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录结果.

表 2 扩增 TVDV *rtp* 基因的引物序列

名称	序列(5'-3')	片段长度/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
TVDV rtp 1 dF	GCCCCACGTTAGAGCTATTGT	689	55
TVDV rtp 1 dR	GTGTGGGTTGAGGTTGAGGT		
TVDV rtp 2 dF	ACGGAACAAAAGGTGTTGCC	801	56
TVDV rtp 2 dR	ATCTCCTTCTCTCCTCGCC		
TVDV rtp 3 dF	TAGATGAGCACCTTGAGGGT	925	55
TVDV rtp 3 dR	TTGGAGTTCAGTGTGCTCGT		

1.5 克隆和测序

参照凝胶回收试剂盒说明书(上海生工生物有限公司)纯化 PCR 产物,回收目的片段与载体 pMD19-T 连接,进行分子克隆,连接反应体系(10 μ L): Solution I 5 μ L, 回收产物 4.5 μ L, pMD19-T Vector 0.5 μ L, 置于 16 $^{\circ}$ C 过夜反应. 将连接产物转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 37 $^{\circ}$ C 培养后挑取单菌落在含抗生素(100 μ g/mL 氨苄青霉素)的 LB 液体培养基中培养,菌液经 PCR 检测后选阳性克隆进行测序分析. 测序结果提交 NCBI 核苷酸数据库进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)序列比对分析.

1.6 扩增片段的拼接与分析

利用 DNASTAR lasergene 软件对获得的 TVDV *rtp* 基因各片段序列进行整理和拼接,得到 TVDV 的 *rtp* 基因全长序列,共获得 7 个 TVDV 分离物的 *rtp* 基因序列. GenBank 数据库已登录的 TVDV *cp* 基因共有 7 个, TVDV *rtd* 区域 4 个(表 3). 利用以上不同 TVDV 分离物进行多重序列比对分析.

表 3 GenBank 数据库中 TVDV *cp* 基因和 *rtd* 区域的信息

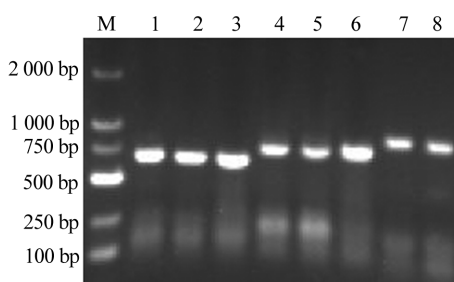
名称	基因登录号(<i>cp</i>)	蛋白登录号(CP)	基因登录号(<i>rtd</i>)	蛋白登录号(RTD)
Longlin	EF529624	ABV01913	EF529624	ABV01915
Baoshan	AF402621	AAM12154.2	—	—
YBSEA	MG674186	AXN72344	—	—
BSh4	AJ704819	CAG28953	—	—
YBSh	MW579560	UKD40734	MW579560	UKD40734
YKMPL	MW579561	UKD40738	MW579561	UKD40738
YK2	OM062616	UZQ18742	OM062616	UZQ18742

注:“—”表示未登录该基因或蛋白.

2 结果与分析

2.1 不同 TVDV 分离物 *rtP* 基因的扩增及序列分析

以 2020—2022 年从云南楚雄、大理、保山和红河采集的感染病毒病烟草为材料,提取植物总核酸后先利用 RT-PCR 技术检测烟草中 TVDV 的感染情况,然后每个地区选择一个含 TVDV 的烟草样品进行 TVDV *rtP* 基因的序列扩增.将 TVDV 的 *rtP* 基因分 3 个片段进行扩增,PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 3 条不同长度的特异性扩增带,得到 TVDV *rtP* 片段 1、*rtP* 片段 2 和 *rtP* 片段 3 分别约为 600 bp、800 bp 和 900 bp 的扩增条带(图 1).将目的条带进行割胶回收、分子克隆,筛选到的阳性单斑送上海生工生物有限公司进行测序,测序所得的序列用 DNASTAR 软件进行序列拼接和分析,最终分别得到来自楚雄、大理和保山及红河的 7 个 TVDV 分离物 *rtP* 基因的全长序列,长度均为 2 172 nt,其中 *cp* 基因的长度为 618 nt, *rtD* 区长度为 1 554 nt;不同 TVDV 分离物均能编码出正确的 TVDV RTP 蛋白,均由 722 个氨基酸组成,其中 CP 蛋白由 205 个氨基酸组成,RTD 由 517 个氨基酸组成.将 TVDV 不同分离物的 *rtP* 基因序列上传至 GenBank 数据库中,获得不同分离物的基因登录号(表 4).



M: DL 2000 marker, 泳道 1~3: TVDV 不同分离物 *rtP* 片段 1 的扩增条带, 泳道 4~6: TVDV 不同分离物 *rtP* 片段 2 的扩增条带, 泳道 7~8: TVDV 不同分离物 *rtP* 片段 3 的扩增条带.

图 1 部分烟草样品 TVDV *rtP* 基因扩增电泳图

表 4 本研究获得的不同 TVDV 分离物 *rtP* 基因序列登录号

名称	基因登录号(<i>rtP</i>)	来源
20YCX	OR187357	楚雄州楚雄市
21YCX	OR187358	楚雄州楚雄市
20YDLWS	OR187359	大理州巍山县
21YDLWS	OR187360	大理州巍山县
20YLY	OR187361	保山市隆阳区
21YLY	OR187362	保山市隆阳区
22YLYX	OR187363	红河州泸西县

2.2 不同 TVDV 分离物的 *cp* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列一致性

为了便于叙述,把测序后到 TVDV 不同分离物 *rtP* 基因按照其组成的 *cp* 基因和 *rtD* 区域两个部分,分别进行序列分析.共获得 7 个 TVDV 分离物 *cp* 基因序列,下载目前 GenBank 数据库登录其他 8 个 TVDV 分离物 *cp* 基因序列,连同本研究获得 7 个 TVDV 分离物 *cp* 基因序列共 15 个 TVDV 分离物的 *cp* 基因序列,进行多重序列比对.这些 TVDV 分离物的 *cp* 基因均

由 618 个核苷酸组成. 比对结果显示, 不同 TVDV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列一致性为 98.71%~100%(表 5, 右上), 其中本研究获得的来自 2021 年楚雄、保山和大理的分离物 21YCX、21YLY、21YDLWS 与来自 GenBank 中登录的保山和昆明分离物 YBSEA、YK2 的 *cp* 基因核苷酸序列完全一致; 来自大理的分离物 20YDLWS 与来自红河的分离物 22YLY 的 *cp* 基因核苷酸序列一致; 2020 年来自楚雄和保山的分离物 20YCX、20YLY 与 GenBank 中登录的其他 TVDV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列均存在差异. 将 15 个 TVDV 分离物的 *cp* 基因推导出相应的氨基酸序列, 发现这些 TVDV 分离物的 CP 蛋白均含有 205 个氨基酸, 多重序列比较分析结果显示, 不同 TVDV 分离物的 CP 蛋白的氨基酸序列一致性为 98.05%~100%(表 5, 左下), 较为保守, 大多数分离物间没有差异. 其中 GenBank 中登录的来自保山的分离物 Longlin 的 CP 蛋白的氨基酸序列与其他分离物均存在差异, 与本研究获得的来自 2020 年的楚雄分离物 20YCX 差异最大, 它们之间的 CP 蛋白的氨基酸序列一致性为 98.05%.

表 5 不同 TVDV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列一致性比对结果 %

TVDV 分离物	20YCX ^a	21YCX ^a	20YDLWS ^a	21YDLWS ^a	20YLY ^a	21YLY ^a	22YLY ^a	Longlin	Baoshan	YBSEA	BSh4	YBSh	MiDu	YKMPL	YK2
20YCX ^a		99.84	99.51	99.84	99.68	99.84	99.51	98.71	99.51	99.84	99.19	99.51	99.68	99.51	99.84
21YCX ^a	99.51		99.68	100	99.84	100	99.68	98.87	99.68	100	99.35	99.68	99.84	99.68	100
20YDLWS ^a	99.02	99.51		99.68	99.51	99.68	100	99.19	99.68	99.68	99.35	99.68	99.84	99.68	99.68
21YDLWS ^a	99.51	100	99.51		99.84	100	99.68	98.87	99.68	100	99.35	99.68	99.84	99.68	100
20YLY ^a	99.51	100	99.51	100		99.84	99.51	98.71	99.51	99.84	99.19	99.51	99.68	99.51	99.84
21YLY ^a	99.51	100	99.51	100	100		99.68	98.87	99.68	100	99.35	99.68	99.84	99.68	100
22YLY ^a	99.02	99.51	100	99.51	99.51	99.51		99.19	99.68	99.68	99.35	99.68	99.84	99.68	99.68
Longlin	98.05	98.54	99.02	98.54	98.54	98.54	99.02		98.87	98.87	98.87	98.87	99.03	98.87	98.87
Baoshan	99.51	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54		99.68	99.35	99.68	99.84	99.68	99.68
YBSEA	99.51	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54	100		99.35	99.68	99.84	99.68	100
BSh4	99.51	99.51	100	99.51	99.51	99.51	100	99.02	99.51	99.51		99.35	99.51	99.35	99.35
YBSh	99.51	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54	100	100	99.51		99.84	100	99.51
MiDu	100	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54	100	100	99.51	100		99.84	99.84
YKMPL	99.51	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54	100	100	99.51	100	98.54		99.68
YK2	99.51	100	99.51	100	100	100	99.51	98.54	100	100	99.51	100	100	100	

注: a 为本研究扩增所得分离物. 表格右上方的数据为不同 TVDV 分离物 *cp* 基因核苷酸序列一致性比对结果, 表格左下方的数据为不同 TVDV 分离物 CP 蛋白氨基酸序列一致性比对结果.

通过将不同 TVDV 分离物的 CP 蛋白的氨基酸进行序列比对, 发现不同分离物间仅存在 4 个氨基酸的差异, 分别为第 6 位、第 41 位、第 55 位和第 145 位氨基酸. 其中来自保山分离物 Longlin 的 CP 蛋白第 6 位的氨基酸为丙氨酸(A), 其余分离物的氨基酸为缬氨酸(V); 第 41 位氨基酸的差异来自保山分离物 Longlin 与其他分离物, Longlin 分离物第 41 位氨基酸为 X, 即未确定, 而其他 TVDV 分离物的氨基酸为精氨酸(R); 本研究获得的大理和红河分离物 20YDLWS、22YLY 及 GenBank 中已登录的保山分离物 Longlin 和 BSh4 的 CP 蛋白第 55 位氨基酸为甘氨酸(G), 其他分离物的氨基酸为丝氨酸(S); 本研究获得的楚雄 20YCX 分离物的 CP 蛋白第 145 位氨基酸是脯氨酸(P), 其他分离物的氨基酸为亮氨酸(L)(图 2).

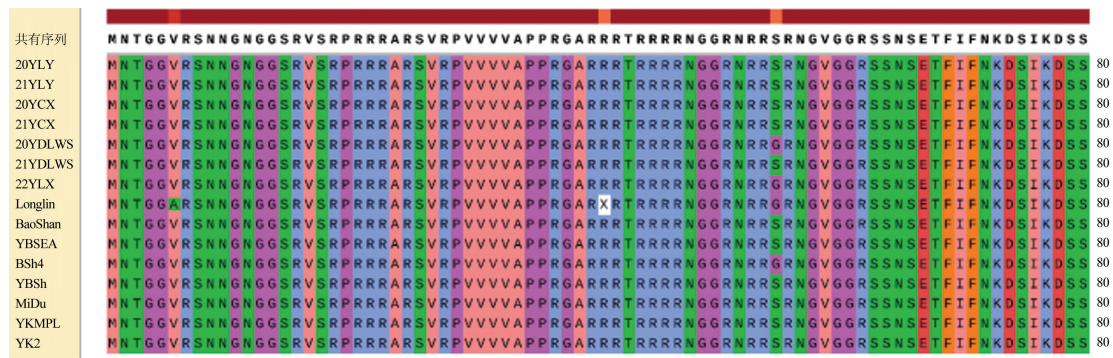


图 2 不同 TVDV 分离物 CP 蛋白的氨基酸序列多重比对结果

2.3 不同 TVDV 分离物的 *rtd* 区核苷酸序列及其推导的氨基酸序列一致性

本研究共获得 7 个 TVDV 分离物 *rtd* 区序列，下载目前 GenBank 数据库中仅登录的 4 个 TVDV 分离物 *rtd* 区序列，共 11 个 TVDV 分离物 *rtd* 区核苷酸序列，进行多重序列比对. 这些 TVDV 分离物的 *rtd* 区均由 1 554 个核苷酸组成，比对结果显示，不同分离物的 *rtd* 核苷酸序列一致性为 96.68%~99.81%(表 6，右上)，说明所有分离物的 *rtd* 核苷酸序列均存在差异，差异最大的为来自楚雄的分离物 21YCX 与来自保山的分离物 Longlin，它们之间的 *rtd* 区域核苷酸序列一致性仅为 96.68%；差异最小的为来自楚雄的分离物 20YCX 与来自昆明的分离物 YK2. 将所有 11 个 TVDV 分离物的 *rtd* 区核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列，发现这些分离物的 RTD 蛋白均含有 517 个氨基酸，多重序列比对结果显示，不同分离物的 RTD 蛋白的氨基酸序列一致性为 96.52%~100%(表 6，左下)，大部分 TVDV 分离物间的 RTD 蛋白的氨基酸序列存在差异. 其中来自保山的分离物 YBSh 与来自昆明的分离物 YKMPL 之间的 RTD 蛋白的氨基酸序列完全一致，其余 TVDV 的分离物 RTD 蛋白的氨基酸序列均存在差异.

表 6 不同 TVDV 分离物 *rtd* 区核苷酸序列及其推导的氨基酸序列一致性比对 %

TVDV 分离物	20YCX ^a	21YCX ^a	20YDLWS ^a	21YDLWS ^a	20YLY ^a	21YLY ^a	22YLX ^a	Longlin	YBSh	YKMPL	YK2
20YCX ^a		99.23	99.55	99.49	99.49	99.42	98.39	97.49	98.46	98.39	99.81
21YCX ^a	98.26		98.20	98.13	98.97	99.29	97.88	96.68	97.94	97.88	99.29
20YDLWS ^a	98.84	97.87		99.42	99.29	99.23	98.46	97.30	98.26	98.20	99.61
21YDLWS ^a	99.51	98.07	98.65		99.23	99.16	98.13	97.23	98.20	98.13	99.55
20YLY ^a	99.51	97.79	98.07	98.26		99.16	98.13	97.23	98.20	98.13	99.55
21YLY ^a	99.51	98.65	98.45	98.65	98.07		98.07	97.17	98.13	98.07	99.29
22YLX ^a	98.45	97.10	98.45	97.87	97.29	97.68		97.75	97.94	97.88	98.46
Longlin	97.49	96.52	97.10	97.29	96.71	97.10	97.68		97.55	97.49	97.55
YBSh	98.65	97.68	98.26	98.45	98.07	98.84	98.45	98.07		99.94	98.52
YKMPL	99.15	97.68	98.26	98.45	97.87	98.26	98.45	98.07	100		98.46
YK2	99.42	98.45	99.03	99.23	97.68	99.03	98.26	97.68	98.84	98.84	

注：a 为本研究扩增所得分离物. 表格右上方的数据为不同 TVDV 分离物 *rtd* 区核苷酸序列一致性比对结果，表格左下方的数据为不同 TVDV 分离物 RTD 蛋白氨基酸序列一致性比对结果.

将 TVDV 不同分离物的 RTD 区域的氨基酸序列进行比对，发现不同 TVDV 分离物序列间存在 39 个氨基酸的差异，RTD 保守区(aa1~260)存在 11 个氨基酸的差异，分别为第 42 位、

44 位、63 位、64 位、88 位、153 位、173 位、216 位、248 位、258 位和 260 位氨基酸. RTD 可变区(aa261~517)存在 27 个氨基酸的差异,分别为第 261 位、270 位、271 位、287 位、291 位、297 位、298 位、302 位、304 位、313 位、337 位、342 位、356 位、360 位、372 位、379 位、390 位、432 位、446 位、463 位、465 位、472 位、499 位、503 位、504 位、508 位和 515 位氨基酸(图 3). 其中, TVDV 不同分离物 RTD 保守区的 11 个氨基酸序列差异具体如下: 本研究获得的楚雄分离物 20YCX 的 RTD 序列第 42 位氨基酸为甘氨酸(G), 其余分离物的氨基酸均为谷氨酸(E); 本研究获得的大理和红河分离物 20YDLWS、22YLX 的 RTD 序列第 44 位氨基酸为甘氨酸(G), 其余分离物为天冬氨酸(D); 本研究获得的大理分离物 21YDLWS 的 RTD 序列第 63 位氨基酸为甘氨酸(G), 其余分离物的氨基酸均为谷氨酸(E); 本研究获得的楚雄分离物 20YCX 的 RTD 序列第 64 位氨基酸为天冬氨酸(D), 其余分离物的氨基酸均为天冬酰胺(N); 本研究获得的大理分离物 21YDLWS 的 RTD 序列第 88 位氨基酸为亮氨酸(L), 其余分离物的氨基酸均为苯丙氨酸(F); 而第 153 位的氨基酸差异为来自保山的分离物 Longlin 与其他分离物之间的差异, 同样的, Longlin 分离物第 153 位氨基酸为 X(即未确定), 而其他 TVDV 分离物的氨基酸为谷氨酰胺(Q); 本研究获得的楚雄分离物 21YCX 的 RTD 序列第 173 位氨基酸为组氨酸(H), 其余分离物的氨基酸均为精氨酸(R); 本研究获得的大理和红河的分离物 20YDLWS、22YLX 的 RTD 序列第 216 位氨基酸为缬氨酸(V), 其余分离物的氨基酸均为甲硫氨酸(M); 本研究获得的保山分离物 20YLY 的 RTD 序列第 248 位氨基酸为亮氨酸(L), 其余分离物的氨基酸均为组氨酸(H); 本研究获得的红河分离物 22YLX 的 TVDV 的 RTD 序列第 258 位氨基酸为亮氨酸(L), 其余分离物的氨基酸均为脯氨酸(P); 本研究获得的红河的分离物 22YLX 与来自保山的分离物 Longlin 的 RTD 序列第 260 位氨基酸为亮氨酸(L), 其余分离物的氨基酸均为脯氨酸(P). TVDV 不同分离物 RTD 可变区的序列差异将不做赘述, 具体见图 3. 由上述分析可知, 本研究获得 TVDV 分离物与 GenBank 中登录的 TVDV 分离物的 RTD 区域发生了很多变异, 其中 RTD 中的保守区发生了 11 个氨基酸的差异, 只是目前尚不清楚这些氨基酸的变异与 TVDV 对烟草的侵染性和经蚜虫传播有何关系.



图 3 不同 TVDV 分离物 RTD 保守区的氨基酸序列多重比对结果

3 讨论

重组和突变在植物病毒中发生较普遍,是影响病毒变异和进化的主要原因^[18-19]. 这种内在的变异可以使病毒适应新的不断变化的环境,对病毒病的发生与流行具有重要的生物学意义. 寄主植物的地理来源、种植栽培条件、环境因素及传播介体都可能影响病毒的分子变异.

TVDV 发生分子变异的原因可能是由于 TVDV 拥有广泛的寄主范围, 能侵染烟草(*Nicotiana tabacum*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、豌豆(*Pisum sativum*)、三七(*Panax notoginseng*)和油菜(*Brassica campestris*)等经济作物以及龙葵(*Solanum nigrum*)、鬼针草(*Bidens pilosa*)和紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)等杂草^[20-23]。在不同作物间交叉感染, 从而引发分子变异。另外, TVDV 是由蚜虫进行传播, 有大量的植物 RNA 病毒在植物和昆虫之间循环, 研究表明病毒在通过昆虫介体传播时, 在昆虫体内和经传播后可能都会发生变异。水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)3'末端区域有 13~17 nt 的延伸在介体昆虫中富集, 在宿主植物中逐渐消除, 并潜在地影响病毒复制^[24]。另外番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)在番茄植株中保持稳定, 但在昆虫介体烟粉虱中的变异是明显的, 且该病毒在不同作物间经烟粉虱传毒后突变更多^[25]。

植物病毒在适应不同的环境条件时会发生株系和致病力等的变化, 因此, 病毒的变异和遗传多样性是普遍存在的^[26]。有些植物病毒的外壳蛋白与病叶组织中的积累量和症状的严重度密切相关, 烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)和马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)的外壳蛋白在致病中起重要作用, 甚至单个氨基酸的改变就能引起寄主植物症状的变化^[27]。有些病毒的外壳蛋白会影响病毒经昆虫介体的传播, 在马铃薯 Y 病毒属病毒(Potyvirus)中, 一个氨基酸的缺失就会影响昆虫介体传播病毒^[28]。另外, 马铃薯卷叶病毒属病毒的 RTP 读通结构域的 C 端会限制病毒感染韧皮部^[29], 这可能就是为什么病毒被限制在韧皮部中的原因。

近年来, 烟草丛顶病在云南的发生频率大大减低, 一方面得益于对其传播介体蚜虫的综合防治^[30], 另一方面可能与其病原物的分子变异有关。TVDV 在自然状态下因 *cp* 基因变异导致无法正常协助 TBTV 进行虫传^[31], TVDV 单独侵染植物相对于其与其他病毒的复合侵染而言, 其致病力较弱, 这可能也是近些年烟草丛顶病在田间发生程度减轻的原因之一。烟草丛顶病主要依靠蚜虫传播, 而 TVDV 又是蚜虫传播的必要病原物, 我们前期研究明确了 TVDV 与蚜虫传毒相关的蛋白为外壳蛋白(CP)和通读蛋白(RTP)^[32]。本研究通过对 2020—2022 年来自云南不同烟区烟草上 TVDV 的 *rtp* 基因序列进行分析, 发现 TVDV 不同分离物间的 CP 蛋白的差异仅 4 个氨基酸。Brault 等^[14]的研究表明 BWYV 的 CP 蛋白第 70 位氨基酸的单一位点发生突变(S-A), 即可影响蚜虫的传播效率, 推测 TVDV 的 CP 蛋白第 55 位氨基酸的突变(S-G)对于蚜虫的传播可能也存在影响。通过分析 TVDV 不同分离物 RTD 区域, 发现不同分离物的氨基酸序列变异较多。Brault 等^[12]的研究表明, BWYV 的 RTD 蛋白在第 59 位氨基酸发生突变后(D-E), 也会影响蚜虫对病毒的传播, 推测 TVDV RTD 蛋白第 44 位氨基酸的突变(D-G)对于蚜虫的传播可能也存在影响。不过, 本研究发现的这些 TVDV 分离物 CP 和 RTD 氨基酸发生的突变, 是否与 TVDV 的致病性和蚜虫传播有关, 需要通过对这些 TVDV RTP 突变体进行致病性测试和蚜虫传毒试验来开展验证。

4 结论

通过对 2020—2022 年来自云南省楚雄州、大理州、保山市及红河州烟草上不同 TVDV 分离物的 *rtp* 基因序列进行分析, 发现近年来云南不同烟区的 TVDV *rtp* 基因均发生了一定程度的变异, 这些差异位点可能 TVDV 的致病性及蚜虫传播相关, 进而影响烟草丛顶病在田间的发生, 但需进一步实验证明。研究结果为 TVDV 的 CP 和 RTD 蛋白功能研究提供了依据, 同时

也为 TVDV 乃至烟草丛顶病的防治提供了参考。

参考文献:

- [1] MO X H, CHEN Z B, CHEN J P. Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of a Chinese Isolate of Tobacco Vein Distorting Virus [J]. *Virus Genes*, 2010, 41(3): 425-431.
- [2] MO X H, CHEN Z B, CHEN J P. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of a Viral RNA Associated with the Chinese Tobacco Bushy Top Disease Complex [J]. *Annals of Applied Biology*, 2011, 158(2): 188-193.
- [3] 尹朝先, 包娜, 冉志伟, 等. TBTV 卫星 RNA 不同分离物的序列测定及系统进化分析 [J]. *云南农业大学学报 (自然科学版)*, 2010, 25(6): 797-801.
- [4] MO X H, QIN X Y, TAN Z X, et al. First Report of Tobacco Bushy Top Disease in China [J]. *Plant Disease*, 2002, 86(1): 74.
- [5] CHEN X J, LUO H M, ZHANG J Y, et al. Synergism among the Four Tobacco Bushy Top Disease Casual Agents in Symptom Induction and Aphid Transmission [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 846857.
- [6] 李凡, 吴建宇, 陈海如. 烟草丛顶病研究进展 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35(5): 385-391.
- [7] GATES L F. A Virus Causing Axillary Bud Sprouting of Tobacco in Rhodesia and Nyasaland [J]. *Annals of Applied Biology*, 1962, 50(1): 169-174.
- [8] XU Y, JU H J, DEBLASIO S, et al. A Stem-Loop Structure in *Potato Leafroll Virus* Open Reading Frame 5 (ORF5) is Essential for Readthrough Translation of the Coat Protein ORF Stop Codon 700 Bases Upstream [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(11): 15-17. .
- [9] BRAULT V, VAN DEN HEUVEL J F, VERBEEK M, et al. Aphid Transmission of Beet Western Yellows Luteovirus Requires the Minor Capsid Read-through Protein P74 [J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(4): 650-659.
- [10] LUCAS G B. Diseases of Tobacco [J]. *Quarterly Review of Biology*, 1965, 45(48): 1421.
- [11] BRAULT V, HERRBACH ?, REINBOLD C. Electron Microscopy Studies on Luteovirid Transmission by Aphids [J]. *Micron*, 2007, 38(3): 302-312.
- [12] BRAULT V, MUTTERER J, SCHEIDECKER D, et al. Effects of Point Mutations in the Readthrough Domain of the Beet Western Yellows Virus Minor Capsid Protein on Virus Accumulation in Planta and on Transmission by Aphids [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(3): 1140-1148.
- [13] BRUYÈRE A, BRAULT V, ZIEGLER-GRAFF V, et al. Effects of Mutations in the Beet Western Yellows Virus Readthrough Protein on Its Expression and Packaging and on Virus Accumulation, Symptoms, and Aphid Transmission [J]. *Virology*, 1997, 230(2): 323-334.
- [14] BRAULT V, BERGDOLL M, MUTTERER J, et al. Effects of Point Mutations in the Major Capsid Protein of Beet Western Yellows Virus on Capsid Formation, Virus Accumulation, and Aphid Transmission [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(5): 3247-3256.
- [15] CHAY C A, GUNASINGE U B, DINESH-KUMAR S P, et al. Aphid Transmission and Systemic Plant Infection Determinants of Barley Yellow Dwarf Luteovirus-PAV are Contained in the Coat Protein Readthrough Domain and 17-kDa Protein, Respectively [J]. *Virology*, 1996, 219(1): 57-65.
- [16] LUCAS W J. Plant Viral Movement Proteins: Agents for Cell-to-Cell Trafficking of Viral Genomes [J]. *Virology*, 2006, 344(1): 169-184.
- [17] LI R, MOCK R, HUANG Q, et al. A Reliable and Inexpensive Method of Nucleic Acid Extraction for the PCR-Based Detection of Diverse Plant Pathogens [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 154(1-2): 48-55.
- [18] 魏太云, 林含新, 谢联辉. 植物病毒分子群体遗传学研究进展 [J]. *福建农业大学学报*, 2003, 32(4): 453-457.
- [19] GARCÍA-ARENAL F, FRAILE A, MALPICA J M. Variation and Evolution of Plant Virus Populations [J]. *International Microbiology*, 2003, 6(4): 225-232.

- [20] TAN S T, LIU F, LV J, et al. Identification of Two Novel Poleroviruses and the Occurrence of Tobacco Bushy Top Disease Causal Agents in Natural Plants [J]. Scientific Reports, 2021, 11: 21045.
- [21] LI Y Y, LIU Q L, XIANG D, et al. First Report of Natural Infection of Tobacco *Bushy Top Virus* on Tomato and Pepper in China [J]. Plant Disease, 2018, 102(7): 1466.
- [22] 杨馨, 孟钰, 李梅蓉, 等. 云南三七病毒病的发生及病毒种类检测 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(4): 456-464.
- [23] 马普权, 刘芳, 谭冠林, 等. 云南烟草丛顶病复合病原物的寄主范围 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(3): 363-368.
- [24] ZHAO W, XU Z T, ZHANG X M, et al. Genomic Variations in the 3'-Termini of Rice *Stripe Virus* in the Rotation between Vector Insect and Host Plant [J]. New Phytologist, 2018, 219(3): 1085-1096.
- [25] YANG X L, WANG B, LUAN J B, et al. Molecular Variation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in the Insect Vector BemisiaTabaci [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16427.
- [26] ROOSSINCK M J. Mechanisms of Plantvirus Evolution [J]. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35: 191-209.
- [27] BEACHY R N, LOESCH-FRIES S, TUMER N E. Coat Protein-Mediated Resistance Against Virus Infection [J]. Annual Review of Phytopathology, 1990, 28: 451-472.
- [28] GADHAVE K R, GAUTAM S, RASMUSSEN D A, et al. Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus [J]. Viruses, 2020, 12(7): 773.
- [29] PETER K A, GILDOW F, PALUKAITIS P, et al. The C Terminus of the Polerovirus P5 Readthrough Domain Limits Virus Infection to the Phloem [J]. Journal of Virology, 2009, 83(11): 5419-5429.
- [30] 杨程. 云南烟区烟草病虫害的立体防治 [J]. 植物医学, 2022, 1(3): 18-24.
- [31] 熊锋, 吴维, 毛倩卓, 等. 利用免疫荧光标记技术分析 TVDV 在介体蚜虫消化道内的分布 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(2): 208-212.
- [32] 张振甲, 王德亚, 于成明, 等. 2 种类型的烟草扭脉病毒外壳蛋白基因的序列和结构分析 [J]. 植物病理学报, 2016, 46(2): 241-246.

责任编辑 王新娟