

云南甘薯病毒的检测及主要病毒的多样性分析

包改丽¹ 左瑞娟¹ 饶维力² LI Ru-Hui³ 李凡^{1,3*}

(1. 云南农业大学 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室 云南 昆明 650201)

(2. 云南省农业广播电视学校 云南 昆明 650032)

(3. USDA-ARS National Germplasm Resources Laboratory MD Beltsville 20705 USA)

摘要:【目的】明确云南甘薯病毒的种类,并对主要病毒进行遗传多样性分析。【方法】利用 PCR/RT-PCR 技术,对采自云南 16 个县、市的 279 个甘薯样品进行扩增、测序,对所得序列应用分子生物学软件 MEGA 5 进行系统发育分析。【结果】除普洱和祥云的样品中未检测到任何病毒外,其余 14 个县、市的 123 个甘薯样品中共检测到甘薯褪绿斑病毒(SPCFV)、甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、甘薯卷叶病毒(SPLCV)、甘薯 C 病毒(SPVC)、甘薯 G 病毒(SPVG)和甘薯病毒 2 号(SPV2)等 6 种病毒。其中 SPVG 的检出率最高,达 39.1%,为云南甘薯病毒的优势种,SPFMV 和 SPVC 的检出率分别为 26.9%和 24.7%,而 SPLCV 检出率最低,仅为 0.4%。在所检测的样品中未发现甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV)和甘薯轻斑驳病毒(SPPMV)。云南甘薯病毒多数为 2–5 种病毒复合侵染,占总样品数的 31.9%,其中 2–3 种病毒复合侵染现象最为常见,单一病毒侵染占总样品数的 12.2%。检出率比较低的 SPCFV、SPLCV 和 SPV2 未发现单独侵染现象。【结论】云南甘薯上发生的 SPFMV 分离物存在 EA 株系和 O 株系,未发现 RC 株系,另有两个分离物同 EA、O、RC 之间的亲缘关系均较远,有可能是一个新的株系;SPVC 和 SPVG 分离物均可分为 3 个不同的组,大部分 SPVG 云南分离物属于 I 组。

关键词: 甘薯病毒病,病原检测,复合侵染,多样性分析

基金项目: 云南省科技创新团队高层次科技人才培养引工程项目(No. 2011HC005); 云南省中青年科技人才培养专项资金(No. 2006PY01-37)

*通讯作者: Tel: 86-871-65227096; 信箱: fanlikm@126.com

收稿日期: 2012-03-21; 接受日期: 2012-05-07

Detection of sweet potato viruses in Yunnan and genetic diversity analysis of the common viruses

BAO Gai-Li¹ ZUO Rui-Juan¹ RAO Wei-Li² LI Ru-Hui³ LI Fan^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Pest Management of China's Education Ministry, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(2. Kunming B&T Agricultural School, Kunming, Yunnan 650032, China)

(3. USDA-ARS, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA)

Abstract: [Objective] To determine the sweet potato virus species in Yunnan and analyze the genetic diversity of the main viruses. **[Methods]** Two hundred seventy-nine sweet potato samples with virus-like symptoms collected from 16 counties/cities in Yunnan Province were tested by RT-PCR/PCR using virus-specific primers for 8 sweet potato viruses. The RT-PCR amplicons of SPFMV, SPVC and SPVG from selected samples were cloned and sequenced. The alignments and phylogenetic analyses were performed with the MEGA 5 software package. **[Results]** Six viruses, sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), sweet potato leaf curl virus (SPLCV), sweet potato virus C (SPVC), sweet potato virus G (SPVG) and sweet potato virus 2 (SPV2), were detected in 123 samples (44.1%) from 14 counties/cities except Puer and Xianyun. Of all the detected viruses, SPVG was detected in 109 samples (39.1%), SPFMV in 75 samples (26.9%), SPVC in 69 samples (24.7%), and SPLCV just in one sample (0.4%). Mixed infections of 2–5 viruses were common (31.90%) in Yunnan. Among the mixed infections, most of them were caused by 2–3 viruses. Only 34 samples (12.2%) were caused by one virus, however, no single infection was detected for SPCFV, SPLCV and SPV2. **[Conclusion]** Sequenced analysis showed that the Yunnan isolates of SPFMV belonged to three strains, EA strain, O strain, and another strain different from EA, O and RC. Both SPVC and SPVG isolates were divided into three groups, and most of the Yunnan SPVG isolates were in the group I.

Keywords: Sweet potato viral disease, Causal agent detection, Mixed infection, Genetic diversity analysis

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 是继小麦、水稻、玉米、马铃薯、大麦和木薯之后的世界第七大粮食作物^[1], 它在世界上 100 多个国家和地区都有种植。甘薯起源于以墨西哥为中心的美洲地区, 但世界上甘薯的大部分产量主要集中在亚洲的中国。甘薯是我国四大主要粮食作物之一, 也是饲料和轻工业的重要原料。目前我国的甘薯年产量已达一亿吨, 占世界总产量的 80% 以上。由

于甘薯主要靠秧蔓和种薯繁殖, 极易造成病毒的积累和传播, 目前病毒病已成为制约甘薯生产的重要因素之一。全世界甘薯每年因病毒病造成的损失高达 30%–50%, 中国每年因甘薯病毒病造成的损失达 40 亿元^[2]。

到目前为止, 全世界已报道的甘薯病毒有 30 多种, 分别属于 9 个科, 既包括 RNA 病毒, 也包括 DNA 病毒^[3–7], 主要为雀麦花叶病毒科

(Bromoviridae, 1 种病毒)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae, 1 种病毒)、花椰菜花叶病毒科(Caulimoviridae, 3 种病毒)、长线病毒科(Closteroviridae, 1 种病毒)、豇豆花叶病毒科(Comoviridae, 1 种病毒)、斐济病毒科(Flexiviridae, 1 种病毒)、双生病毒科(Geminiviridae, 15 种病毒)、黄症病毒科(Luteoviridae, 1 种病毒)和马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae, 9 种病毒)。在这些病毒中,甘薯羽状斑驳病毒(Sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)被认为为害最为普遍,且 SPFMV 通常以与甘薯褪绿矮化病毒(Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)复合侵染的方式引起甘薯病毒病(Sweet potato virus disease, SPVD)。SPFMV 单独侵染时不表现症状或者症状比较轻微,目前分为 3 个株系:East-African (EA)、Ordinary (O)以及 Russet crack (RC)。最近的研究表明,马铃薯 Y 病毒属的病毒之间很容易发生重组,SPFMV 的 10-O 株系很可能是 O 株系、EA 株系、RC 株系之间重组的结果^[8]。我国于 20 世纪 50 年代首次报道了甘薯病毒病的发生,以后陆续有甘薯病毒病发生和防治的研究报道^[9-11]。Colinet 和 Kummert^[12]于 1993 年在中国发现了 SPFMV (SPFMV-CH),该分离物同 SPFMV 的 RC 株系亲缘关系最近。甘薯 C 病毒(Sweet potato virus C, SPVC)过去被认为是 SPFMV 的 C 株系(Common 株系),随着 C 株系全基因组序列的完成,2010 年已被列为一个独立的种^[13]。甘薯 G 病毒(Sweet potato virus G, SPVG)最早发现于中国^[14],后来在非洲、亚洲、美洲、欧洲和大洋洲的许多国家都有发现^[15-20]。而甘薯病毒 2 号(Sweet potato virus 2, SPV2),有的称为甘薯 Y 病毒(Sweet potato virus Y, SPVY)^[21]或甘薯脉花叶病毒(Ipomoea vein mosaic virus, IVMV)^[16]自中国台湾地区首次发现后,也逐渐在很多国家发现^[16,22-25]。Ateka 等于 2007 年首次在中国大陆发现了 SPV2^[23]。

SPVG 和 SPV2 单独侵染甘薯也往往不产生明显症状,但是这些病毒在田间往往以复合侵染的方式存在,给生产造成了严重的损失^[23]。

甘薯是云南省重要的粮食作物之一,栽培历史悠久,但长期以来对云南甘薯病毒病的研究报道却很少。为了明确云南甘薯病毒的种类和分布情况,本研究对云南 16 个产甘薯的市、县进行了甘薯病毒病的调查和疑似样品采集,利用 RT-PCR/PCR 扩增、克隆、测序分析等方法,对云南甘薯病毒病病原物的种类进行检测和鉴定,以期今后甘薯病毒病的防控工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年从云南 16 个市、县共采集了疑似病毒病症状的甘薯病毒病样品 279 份,采用 CTAB 法^[26]提取样品总核酸。8 种病毒的阳性对照为 USDA-NGRL 保存材料。

1.2 特异性引物设计与合成

根据文献中已报道的相关病毒检测引物序列合成多条检测引物,或从 GenBank 中下载相关病毒序列后选择每一种病毒中较为保守的 CP、NIb 基因等设计合成 4-11 对病毒检测引物,从中选择检测结果稳定、特异性强的引物用于田间大批量样品的检测。所用引物序列如表 1 所示。

1.3 PCR 扩增

利用甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl virus, SPLCV)的特异性引物 SPG1/SPG2,用 QIAGEN 公司的 HotStart PCR Kit 试剂盒进行 PCR 扩增。反应体系为 30 μ L,其中包括 10 \times Reaction buffer 3 μ L, ddH₂O 13.8 μ L, Q solution 6 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 5'端引物 1 μ L, 3'端引物 1 μ L, Qiagen HotStart Taq pol 0.2 μ L, DNA 模板 2 μ L。依次加入上述试剂,轻弹管壁充分混匀,稍离心后置 PCR 管于 Bio-Rad

表 1 用于 8 种甘薯病毒检测的引物
Table 1 Primers used for 8 sweet potato viruses detection

病毒名称 Virus name	引物名称 Primer name	方向 Direction	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Expected size (kb)
SPCFV	PMB-15 ^[24]	F	CTATGCTGCTCACTCAAGC	0.60
	PMB-16 ^[24]	R	TTGATTGGCCACAAGCGAAG	
SPCSV	CSCP15F ^[27]	F	AGTAAACGATGACAAGAACT	0.15
	CSCP147	R	CATGTCTCTTCTTCCCACA	
SPFMV	SPFMVMDFb	F	GGATTAYGGTGTGACGAC	0.60
	FGYCPDRb	R	TCGGGACTGAARGAYACGAATTTAA	
SPLCV	SPG1 ^[15]	F	CCCCCKGTGCGWRAATCCAT	0.90
	SPG2 ^[15]	R	ATCCVAAYWTYCAGGGAGCTAA	
SPMMV	SPMMVF	F	CAAAGCTGGACAAGGAGCG	0.70
	SPMMVR	R	ACAATCCATGCTGGCAGTACT	
SPVC	SPVCMDFa	F	GTGAGAAAYCTATGCGCTCTGTT	0.80
	FGYCPDRb	R	TCGGGACTGAARGAYACGAATTTAA	
SPV2	SPYMDFe	F	CGTACATTGAAAAGAGAAACAGGATA	0.40
	FGYCPDRb	R		
SPVG	SPGCPF _a	F	GTATGAAGACTCTCTGACAAATTTTG	1.20
	FGYCPDRb	R		

C1000 Thermal Cycler 中, 进行 PCR 反应。反应程序为 95 °C 2 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。取出 5 μL 于 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 其余于-20°C 保存备用。

1.4 一步法 RT-PCR 扩增

利用甘薯褪绿斑病毒(Sweet potato chlorotic fleck virus, SPCFV)、SPCSV、SPFMV、甘薯轻斑驳病毒(Sweet potato mild mottle virus, SPMMV)、SPVC、SPV2、SPVG 的特异性引物(表 1), Invitrogen 公司的 SuperScript III one-step RT-PCR System with Platinum *Taq* High Fidelity 试剂盒进行一步法 RT-PCR 扩增。反应体系为 20 μL, 其中包括 2×Reaction mix 10 μL、5'端引物 0.5 μL、3'

端引物 0.5 μL、H₂O 7.6 μL、RNA 模板 1 μL、Enzyme mix 0.4 μL。依次加入上述试剂, 轻弹管壁充分混匀, 稍离心后置 PCR 管于 Bio-Rad C1000 Thermal Cycler 中, 进行 RT-PCR 反应。反应程序为 50 °C 反转录 30 min; 95 °C 2 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 68 °C 1 min, 扩增 30 个循环; 68 °C 5 min。后 4 °C 保存。反应结束后, 取 5 μL 于 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 其余于-20 °C 保存备用。

1.5 PCR 产物 cDNA 的克隆

电泳检测后, 对不同病毒的扩增片段进行切割, 然后用 QIAGEN 公司的 QIAquick PCR Purification Kit 试剂盒进行纯化。按照制造商提供的产品使用要求将纯化后的产物连接到 pGEM®-T

Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)载体上。用 FastPlasmid Mini Kit (5 PRIME, Gaithersburg, MD, USA)试剂盒对过夜培养后的菌液提取质粒 DNA。酶切和 PCR 双重鉴定后至少选取 3 个阳性克隆子用于测序。

1.6 序列分析

所获得的序列用在线分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行同源性比对,应用 MEGA 5 生物软件对 SPVG、SPFMV、SPVC 不同分离物的序列和 GenBank 中登录的序列进行系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 甘薯病毒检测结果

利用 SPCFV、SPFMV、SPLCV、SPVC、SPVG 和 SPV2 的特异性引物均扩增到了预期片段大小的目标条带,但利用 SPCSV 以及 SPMNV 的特异性引物除阳性对照外所有样品均未扩增到目标条带,对扩增获得的 cDNA 片段进行了序列测定验证。

在 279 个样品中,从 123 个样品中检测到了 SPCFV、SPFMV、SPLCV、SPVC、SPVG 和 SPV2 6 种病毒,检出率为 44.1%,未检测到 SPCSV 和 SPMNV。其中有 109 个样品检测到 SPVG (31.1%),检出率最高,其次为 SPFMV,检出率为 26.9%,SPVC 为 24.7%,SPV2 检出率为 4.7%,检出率最低的是 SPCFV 和 SPLCV,分别为 0.7% 和 0.4%。有 89 个样品发生了 2-5 种病毒的复合侵染,占总样品数的 31.9%,占检出样品数的 72.4%,其中 SPCFV、SPFMV、SPVC、SPVG、SPV2 5 种病毒复合侵染为 0.4%;4 种病毒复合侵染中,SPCFV、SPFMV、SPVC、SPVG 之间复合侵染为 0.4%,SPFMV、SPVC、SPVG、SPV2 之间复合侵染为 2.5%;3 种病毒复合侵染中,SPFMV、SPVC、SPVG 之间复合侵染为 12.2%,SPFMV、SPV2、SPVG 之间复合侵染为 1.1%,

SPV2、SPVC、SPVG 之间复合侵染为 0.4%;2 种病毒复合侵染中,SPFMV 和 SPLCV 之间复合侵染为 0.4%,SPFMV 和 SPVC 之间复合侵染为 0.7%,SPFMV 和 SPVG 之间复合侵染为 6.1%,SPVC 和 SPVG 之间复合侵染为 7.5%,SPVC 和 SPV2 之间复合侵染为 0.4%。有 34 个样品为单个病毒侵染,占总样品数的 12.2%,其中 SPFMV 为 3.2%、SPVC 为 0.4%、SPVG 为 8.6%。检出率比较低的 SPCFV、SPLCV 和 SPV2 均未发现单独侵染现象,表明这些病毒在云南多以复合侵染的方式存在。我们调查的 16 个县市中有 14 个县市的甘薯病毒病都有不同程度的发生,并且同一个地区,大多不止一种甘薯病毒感染,建水检测到的病毒种类最多,有 5 种;蒙自最少,只有 1 种;而普洱和祥云两个地区没有检测到病毒(表 2)。

2.2 SPFMV 和 SPVC 云南分离物系统进化分析

从 NCBI 数据库中下载 SPFMV 的 EA 株系 4 个分离物、O 株系 4 个分离物、RC 株系 5 个分离物、SPVC 6 个分离物,连同本研究所获得的有代表性的 7 个 SPFMV 分离物(基因登录号为 JQ775871-JQ775877)和 9 个 SPVC 分离物(基因登录号为 JQ775893-JQ775901),共 35 个分离物的部分 CP 基因核苷酸序列一起(表 3),用分子生物学软件 MEGA 5 做系统发育树(图 1)。从图 1 可以看出,SPFMV 的 3 个株系中,RC 同 EA 亲缘关系最近。来自云南的 SPFMV 分离物 Jianshui10、Jianshui3 和 Qujing6 均属于 EA 株系, Cangyuan1 和 Binchuan14 可划分到 O 株系。而 Jianshui7 和 Wenshan7 同 SPFMV 的 EA、O 和 RC 3 个株系亲缘关系均较远,同 SPVC 亲缘关系也较远,因此有可能是一个新的株系。这表明 SPFMV 云南分离物之间的差异较大,不同分离物间存在较大的变异。SPVC 云南分离物大致可以分为 3 个组, Wenshan14、Kunming85、Jianshui8、Binchuan16、

Qujing2、Wenshan5 和 Lincang1 同其他已报道的 SPVC 51-9s、M2-63、SR、C1 和 Nam12 聚为一组; 云南分离物 Jianshui9 为一组; 云南分离物 Wenshan4 和美国分离物 YV 为另一组。表明 SPVC 在云南的变异也较大, 有可能属于不同的株系。

表 2 云南 16 个县、市甘薯病毒的检测结果
Table 2 Sweet potato virus detection results in 16 counties/cities of Yunnan Province

地点 Location	病毒名称 Virus name							
	SPCFV	SPCSV	SPFMV	SPLCV	SPMMV	SPVC	SPVG	SPV2
建水 Jianshui	+	-	+	-	-	+	+	+
开远 Kaiyuan	-	-	+	+	-	+	+	-
弥勒 Nile	-	-	+	-	-	+	+	-
蒙自 Mengzi	-	-	-	-	-	-	+	-
峨山 Eshan	-	-	+	-	-	+	+	+
元江 Yuanjiang	-	-	+	-	-	-	+	-
宾川 Binchuan	-	-	+	-	-	+	+	-
祥云 Xiangyun	-	-	-	-	-	-	-	-
临沧 Lincang	-	-	+	-	-	+	+	-
沧源 Cangyuan	-	-	+	-	-	+	+	-
昆明 Kunming	-	-	+	-	-	+	+	+
永胜 Yong-sheng	+	-	+	-	-	+	+	-
文山 Wenshan	-	-	+	-	-	+	+	+
普洱 Puer	-	-	-	-	-	-	-	-
曲靖 Qujing	-	-	+	-	-	+	+	-
楚雄 Chuxiong	-	-	+	-	-	+	+	+

注: +: 检测到相关病毒; -: 未检测到相关病毒.
Note: +: The virus was detected; -: The virus was not detected.

表 3 本文所采用的 SPFMV 和 SPVC 分离物
Table 3 SPFMV and SPVC isolates used in this study

病毒名称 Virus name	分离物 Isolates	株系 Strain	发生地 Location	GenBank 登录号 GenBank accession No.
SPFMV	M2-44	EA	Peru	EU021069
	Piu	EA	Peru	EU021072
	SP-33	EA	Peru	EU021068
	Piu3	EA	Peru	FJ155666
	O	O	Japan	D16664
	10-O	O	Japan	AB438224
	K2	O	Korea	AF0155441
	TZ4	O	Argentina	U96624
	Aus5	RC	Australia	AJ781776
	Aus6	RC	Australia	AJ781777
	Aus2	RC	Australia	AJ781775
	Eg1	RC	Egypt	AJ515378
	Eg9	RC	Egypt	AJ515379
	Binchuan14	O	Yunnan, Binchuan	JQ775871
	Cangyuan1	O	Yunnan, Cangyuan	JQ775872
	Jianshui3	EA	Yunnan, Jianshui	JQ775873
	Jianshui10	EA	Yunnan, Jianshui	JQ775875
	Qujing6	EA	Yunnan, Qujing	JQ775876
	Jianshui7		Yunnan, Jianshui	JQ775874
	Wenshan7		Yunnan, Wenshan	JQ775877
SPVC	51-9S		Kenya	AY459591
	Nam 12		Uganda	AY459596
	SR		Peru	EU021063
	M2-63		Peru	EU021060
	C1		Peru	EU021057
	YV		USA	EU021058
	Binchuan16		Yunnan, Binchuan	JQ775893
	Jianshui8		Yunnan, Jianshui	JQ775894
	Jianshui9		Yunnan, Jianshui	JQ775895
	Kunming85		Yunnan, Kunming	JQ775896
	Lincang1		Yunnan, Lincang	JQ775897
	Qujing2		Yunnan, Qujing	JQ775898
	Wenshan4		Yunnan, Wenshan	JQ775899
	Wenshan5		Yunnan, Wenshan	JQ775900
	Wenshan14		Yunnan, Wenshan	JQ775901

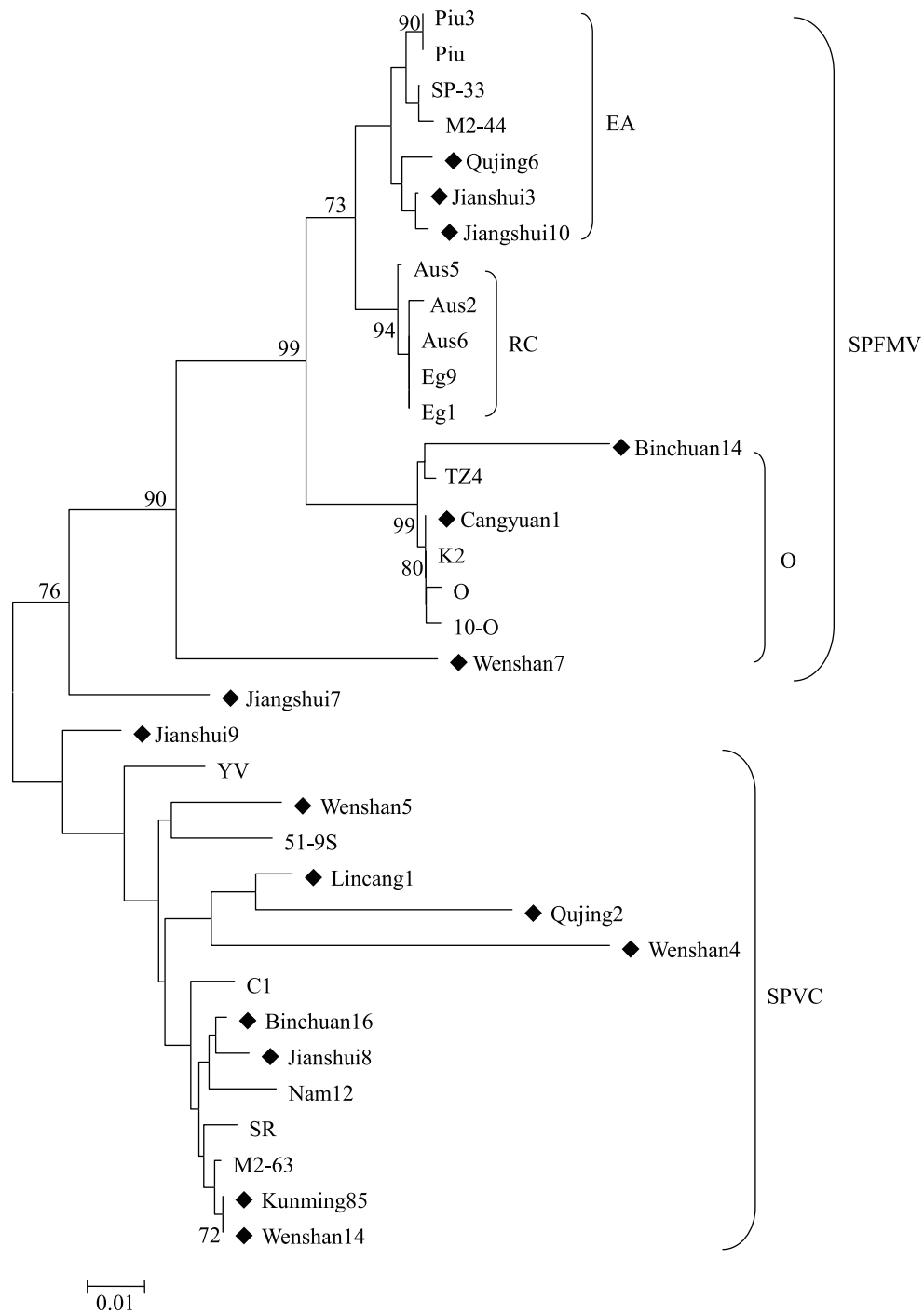


图 1 Neighbor-Joining 法构建的 SPFMV 和 SPVC 不同分离物部分 CP 基因核苷酸序列的系统发育树
Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic dendrograms based on the partial CP gene nucleotide sequences of different SPFMV and SPVC isolates

注: ◆: 本研究获得的分离物; EA、RC 和 O: EA 株系、RC 株系和 O 株系. 标尺代表 0.01 Kimura 单位; 分支上的数值代表 1 000 次重复抽样检测的 Bootstrap 值, 只有大于 70% 支持率的才显示出来.

Note: ◆: The isolates described in this study. EA, RC and O: The EA strain, RC strains and O strain respectively. The bar represents 0.01 Kimura units. The numbers on branches represent the bootstrap values calculated with 1 000 replicates, and only values over 70% are shown.

2.3 SPVG 云南分离物系统进化分析

从 NCBI 下载 8 个 SPVG 分离物, 加上本研究获得的 16 个有代表性的 SPVG 分离物的部分 CP 基因核苷酸序列(基因登录号为 JQ775878–JQ775892) (表 4), 用分子生物学软件 MEGA 一起构建系统发育树。从图 2 可以看出, SPVG 也大致可以分为 3 组, 分离物 Ch2 同 Yunnan 聚为一组

(III 组); Hua2 单独为一组(II 组); 本研究所获得的 16 个云南分离物同其他已报道的 SPVG Belgium、Egypt1、Sichuan-1、Henan、SP1 以及 Oita 聚为一组(I 组)。除 Yunnan 分离物外, 云南不同地区 SPVG 分离物之间亲缘关系很近, 仅 Yongsheng4 分离物同 I 组中其他分离物之间的亲缘关系相对较远。

表 4 本研究所采用的 SPVG 分离物 Table 4 SPVG isolates used in this study		
分离物 Isolates	发生地 Location	GenBank 登录号 GenBank accession No.
Belgium	Belgium	X76944
Ch2	China: Guangdong	Z83314
Egypt1	Egypt: Cairo	AJ515380
Henan	China: Henan	DQ399861
Hua2	Peru: Huaral	EU218528
Sichuan-1	China: Sichuan	EU218531
Oita	Japan	AB435072
SP1	New Zealand	EF514221
Yunnan	China: Yunnan	HQ844203
Jianshui3	Yunnan, Jianshui	JQ775878
Jianshui5	Yunnan, Jianshui	JQ775879
Jianshui6	Yunnan, Jianshui	JQ775880
Jianshui7	Yunnan, Jianshui	JQ775881
Jianshui8	Yunnan, Jianshui	JQ775882
Jianshui19	Yunnan, Jianshui	JQ775883
Jianshui20	Yunnan, Jianshui	JQ775884
Kunming85	Yunnan, Kunming	JQ775885
Wenshan2	Yunnan, Wenshan	JQ775886
Wenshan3	Yunnan, Wenshan	JQ775887
Wenshan15	Yunnan, Wenshan	JQ775888
Wenshan16	Yunnan, Wenshan	JQ775889
Yongsheng1	Yunnan, Yongsheng	JQ775890
Yongsheng3	Yunnan, Yongsheng	JQ775891
Yongsheng4	Yunnan, Yongsheng	JQ775892



图2 Neighbor-Joining 法构建的 SPVG 不同分离物部分 CP 基因核苷酸序列的系统发育树
Fig. 2 Neighbor-Joining phylogenetic dendrograms based on the partial CP gene nucleotide sequences of different SPVG isolates

注：◆：本研究获得的分离物；I、II和III分别代表I组、II组和III组。标尺代表0.02 Kimura 单位；分支上的数值代表1 000次重复抽样检测的 Bootstrap 值，只有大于70%支持率的才显示出来。

Note: ◆: The isolates described in this study. I, II and III represent group I, II and III respectively. The bar represents 0.02 Kimura units. The numbers on branches represent the bootstrap values calculated with 1 000 replicates, and only values over 70% are shown.

3 讨论

本次调查的地区涵盖了云南主要的甘薯主产

区。在采集的279个样品中，从123个样品中检测到了6种病毒，病毒的发生率为44.1%，其中SPVG发生率最高，其次为SPFMV，检出率最低

的是 SPLCV。我们调查的 16 个地区中 14 个地区的病毒病均有不同程度的发生,而普洱和祥云两个地区没有检测到病毒,可能与这两个地区采集的样品较少有关,并不代表这两个地区没有甘薯病毒病的发生,从建水检测到了 5 种病毒,应引起高度重视。这些病毒多数以 2-5 种复合侵染的方式存在,单独侵染现象不多。由于甘薯主要靠扦插枝条进行繁殖,SPFMV、SPVG、SPVC 和 SPV2 同为马铃薯 Y 病毒属病毒,传播介体为蚜虫,能通过汁液摩擦传播,这就造成了它们之间较高的复合侵染率。目前,国内外已从染病甘薯中鉴定出 15 种双生病毒^[7],本文仅用 SPLCV 特异引物对所收集的甘薯材料进行病毒检测,因此不排除云南甘薯还感染了其他双生病毒的可能。本研究所获得的 7 个 SPFMV 分离物中,有 3 个属于 EA 株系,2 个属于 O 株系,没有检测到 RC 株系,另外 2 个分离物同 EA、O、RC 株系的亲缘关系均较远,有可能是新的株系。到目前为止,中国已经报道了 SPFMV 的 RC 株系和 O 株系,尚未见 EA 株系的相关报道。近年来,EA 株系的许多分离物在西班牙及葡萄牙^[28]、越南^[29]、秘鲁^[19]以及太平洋的一些岛国^[18]等许多国家和地区被检测出来,从这些 EA 株系的地理分布来看,已经远远超出了最初认为的 EA 株系仅存在于非洲东部国家(East-African)^[30-32]的范围,本研究所获得的 3 个 EA 株系的分离物同张振臣等在 GenBank 上登录的部分 SPFMV 序列的一致性在 91%-99%之间,说明 EA 在中国的发生还是比较普遍的。因此,EA 株系这个名称有可能要进行更改。在之前的很多报道中,大多认为 SPFMV 是我国甘薯病毒病的主要优势病毒,由于 SPVC 同 SPFMV 之间亲缘关系很近,SPVC 最近才从 SPFMV 的 C 株系独立出来^[13],有时血清学并不能完全将 SPFMV 同 SPVC 区分开来,本研究同 SPVC 同 SPFMV 的发生率几乎相等,因此推测早

期报道的 SPFMV 中有很有一部分可能是 SPVC。就目前的检测结果来看,SPVG 是危害云南甘薯的主要病毒。相对来讲,SPV2 和 SPVG 不同分离物之间的变异较 SPFMV 各分离物之间要小,而 SPV2 不同分离物之间的变异稍大于 SPVG 各分离物。

目前我国学者在部分以字母编号命名的甘薯病毒中文名称翻译方面有些混乱,例如 SPVG 有的翻译为甘薯 G 病毒,有的翻译为甘薯病毒 G,有的在同一篇文章中这两种叫法同时出现。我们认为最好遵循马铃薯病毒中文名称的翻译惯例,如 Potato virus A 翻译成马铃薯 A 病毒、Potato virus Y 翻译成马铃薯 Y 病毒、Potato virus X 翻译成马铃薯 X 病毒等,将 Sweet potato virus G 翻译成甘薯 G 病毒、Sweet potato virus C 翻译成甘薯 C 病毒。而对于以数字编号命名的甘薯病毒,我们建议参照 Pea enation mosaic virus 2 翻译为豌豆耳突花叶病毒 2 号、Broad bean wilt virus 2 翻译为蚕豆萎蔫病毒 2 号等惯例,将 Sweet potato virus 2 翻译成甘薯病毒 2 号。国内外对 SPV2 也先后有不同的名称报道,由于这是甘薯中发现的第二种病毒,因此最初被称为 Sweet potato virus II 或 Sweet potato virus 2^[23],后来有的称为 Ipomoea vein mosaic virus (IVMV)^[16],有的称之为甘薯 Y 病毒(Sweet potato virus Y)^[21],还有的称为甘薯脉花叶病毒(Sweet potato vein mosaic virus, SPVMV)^[10],目前 Sweet potato virus 2 已被国际病毒分类委员会(ICTV)接受^[34],而 SPVMV 专指目前仅在阿根廷发现的另一种甘薯病毒^[7,35]。

本研究中没有在云南发现 SPCSV,而乔奇等^[10]在广东、江苏、福建、四川的样品中均检测到了 SPFMV 同 SPCSV 的复合侵染,但 Wang 等^[33]只在山东检测到 SPCSV,没有发现 SPVD,说明目前 SPVD 在中国不是普遍存在。到目前为止,在甘薯中已经发现了 30 多种病毒,中国已经报

道了 11 种甘薯病毒^[33]。由于本研究只用了 8 种病毒的引物进行检测, 至于是否存在其他病毒侵染还有待于进一步研究。由于甘薯主要靠扦插枝条进行繁殖, 极易造成病毒的大范围传播, 而甘薯上的病毒多数是以复合侵染的方式存在, 这给防治工作带来了一定的难度。因此, 进一步探明我国甘薯病毒发生的种类及其分布对于开展种苗脱毒及病害防治就显得尤为重要。

致谢: 感谢 USDA-ARS, National Germplasm Resources Laboratory 的 Whitney Hymes 在实验过程中给予的帮助!

参 考 文 献

- [1] FAO. FAOSTAT database (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2009.
- [2] 张雅琼, 郭华春. 甘薯茎尖分生组织培养的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 74.
- [3] Luan YS, Zhang J, Liu DM, et al. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae[J]. Virus Genes, 2007, 35(2): 379–385.
- [4] Valverde RA, Clark CA, Valkonen JPT. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato[J]. Plant Viruses, 2007, 1(1): 116–126.
- [5] Lozano G, Trenado HP, Valverde RA, et al. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(10): 2550–2562.
- [6] Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, et al. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank[J]. Virus Research, 2010, 149(2): 224–233.
- [7] Clark CA, Davis JA, Abad JA, et al. Sweetpotato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. Plant Disease, 2012, 96(2): 168–185.
- [8] Yamasaki S, Sakai J, Fuji S, et al. Comparisons among isolates of Sweet potato feathery mottle virus using complete genomic RNA sequences[J]. Archives of Virology, 2010, 155(5): 795–800.
- [9] 张立明, 王庆美, 马代夫, 等. 甘薯主要病毒病及脱毒对块根产量和品质的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 316–320.
- [10] 乔奇, 张德胜, 秦艳红, 等. 中国甘薯病毒种类的初步鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 42(1): 10–16.
- [11] 王庆美, 王荫墀, 王建军, 等. 甘薯病毒病研究进展[J]. 山东农业科学, 1994(4): 36–39.
- [12] Colinet D, Kummer J. Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers[J]. Journal of Virological Methods, 1993, 45(2): 149–159.
- [13] Untiveros M, Quispe D, Kreuze J. Analysis of complete genomic sequences of isolates of the Sweet potato feathery mottle virus strains C and EA: Molecular evidence for two distinct potyvirus species and two P1 protein domains[J]. Archives of Virology, 2010, 155(12): 2059–2063.
- [14] Colinet D, Nguyen M, Kummert J, et al. Differentiation among potyviruses infecting sweet potato based on genus- and virus-specific reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Plant Disease, 1998, 82(2): 223–229.
- [15] IsHak JA, Kreuze JF, Johansson A, et al. Some molecular characteristics of three viruses from SPVD-affected sweet potato plants in Egypt[J]. Archives of Virology, 2003, 148(12): 2449–2460.
- [16] Souto ER, Sim J, Chen J, et al. Properties of strains of Sweet potato feathery mottle virus and two newly recognized Potyviruses infecting sweet potato in the United States[J]. Plant Disease, 2003, 87(10): 1226–1232.
- [17] Trenado HP, Lozano G, Valverde RA, et al. First report of Sweet potato virus G and sweet potato virus 2 infecting sweet potato in Spain[J]. Plant

- Disease, 2007, 91(12): 1687.
- [18] Rännäli M, Czekaj V, Jones RAC, et al. Molecular characterization of Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) isolates from Easter Island, French Polynesia, New Zealand, and southern Africa[J]. Plant Disease, 2009, 93(9): 933–939.
- [19] Untiveros M, Fuentes S, Kreuze J. Molecular variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru[J]. Archives of Virology, 2008, 153(3): 473–483.
- [20] Yamasaki S, Sakai J, Kamisoyama S, et al. Identification of sweet potato virus G isolated from sweet potato in Japan[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2009, 75(2): 102–108.
- [21] Ateka EM, Barg E, Njeru RW, et al. Further characterization of ‘sweet potato virus 2’: a distinct species of the genus Potyvirus[J]. Archives of Virology, 2004, 149(2): 225–239.
- [22] Tairo F, Jones RAC, Valkonen JPT. Potyvirus complexes in sweetpotato: occurrence in Australia, serological and molecular resolution, and analysis of the sweet potato virus 2 (SPV2) component[J]. Plant Disease, 2006, 90(9): 1120–1128.
- [23] Ateka EM, Barg E, Njeru RW, et al. Biological and molecular variability among geographically diverse isolates of sweet potato virus 2[J]. Archives of Virology, 2007, 152(3): 479–288.
- [24] Jones RAC, Dwyer GI. Detection of sweet potato chlorotic fleck virus and sweet potato feathery mottle virus – strain O in Australia[J]. Australasian Plant Pathology, 2007, 36(6): 591–594.
- [25] Perez-Egusquiza Z, Ward LI, Clover GRG, et al. Detection of sweet potato virus 2 in sweet potato in New Zealand[J]. Plant Disease, 2009, 93(4): 427.
- [26] 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.
- [27] Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT. Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweetpotato plants[J]. Plant Pathology, 2006, 55(3): 458–467.
- [28] Valverde RA, Lozano G, Navas-Castillo J, et al. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus and Sweet potato feathery mottle virus infecting sweet potato in Spain[J]. Plant Disease, 2004, 88(4): 428.
- [29] Ha C, Revill P, Harding RM, et al. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam[J]. Archives of Virology, 2008, 153(1): 45–60.
- [30] Kreuze JF, Karyeija RF, Gibson RW, et al. Comparisons of coat protein gene sequences show that East African isolates of Sweet potato feathery mottle virus form a genetically distinct group[J]. Archives of Virology, 2000, 145(3): 567–574.
- [31] Mukasa SB, Tairo F, Kreuze JF, et al. Coat protein sequence analysis reveals occurrence of new strains of Sweet potato feathery mottle virus in Uganda and Tanzania[J]. Virus Genes, 2003, 27(1): 49–56.
- [32] Tairo F, Mukasa SB, Jones RAC, et al. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in sweet potato virus disease (SPVD) and its practical implications[J]. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(2): 199–211.
- [33] Wang QM, Zhang LM, Wang B, et al. Sweetpotato viruses in China [J]. Crop protection, 2010, 29(2): 110–114.
- [34] King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[C]. San Diego: Academic Press, 2012: 1076.
- [35] Nome, SF. Sweet potato vein mosaic virus in Argentina[J]. Journal of Phytopathology, 1973, 77(1): 44–45.