

云南番木瓜环斑病毒的发生及遗传多样性

朱静¹ 谭冠林² 包改丽¹ 刘芳¹ 李晓静¹ 吴祖建^{3*} 李凡^{1*}

(1. 云南农业大学 农业生物多样性应用技术国家工程研究中心 云南 昆明 650201)

(2. 云南农业大学 现代教育技术中心 云南 昆明 650201)

(3. 福建农林大学 植物病毒研究所 福建省植物病毒学重点实验室 福建 福州 350002)

摘要:【目的】明确云南省番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV)发生情况, 并对其遗传多样性分析。【方法】利用 RT-PCR 技术, 于 2011–2012 年对采自云南省昆明市、楚雄州、保山市、德宏州、西双版纳州、临沧市、玉溪市、红河州、文山州等地的 24 个番木瓜、南瓜和罗汉果疑似病样进行扩增、测序, 对样品中获得的 940 bp PRSV 部分 *cp* 基因及 3' 端非编码区的序列应用分子生物学软件 MEGA 5 进行系统发育分析。【结果】从 17 个样品中检测到了 PRSV, 检出率为 70.8%, 表明该病毒在云南的发生较为普遍。云南 PRSV 不同分离物间的核苷酸序列变异较大, 与其他已报道的 PRSV 分离物之间的基因组 3' 端核苷酸序列一致性为 81.7%–100%。基于 PRSV 的 CP 部分氨基酸序列及基因组 3' 端核苷酸的系统进化分析结果表明, 来自亚洲、北美洲、南美洲和大洋洲的 PRSV 分离物可以分为 2 个组, 其中第 I 组均为来自中国的分离物, 包括了大部分的 PRSV 云南分离物, 第 I 组内分离物间的差异较第 II 组大; 第 II 组的分离物来源较为复杂, 亚洲、北美洲、南美洲和大洋洲均有分布。基于 PRSV CP 部分氨基酸序列构建的系统进化树中, 各分离物之间没有明显的地理和寄主相关性, 而基于 PRSV 基因组 3' 端核苷酸序列构建的系统进化树中, 除中国大陆分离物和印度分离物外, 其他地区的 PRSV 在进化上与其地理来源有明显的相关性。【结论】PRSV 在云南的昆明市、楚雄州、保山市、德宏州、西双版纳州、临沧市、玉溪市、红河州和文山州等地都有不同程度发生, 且为害寄主植物涉及番木瓜、南瓜及罗汉果, PRSV 侵染罗汉果为云南首次发现。云南 PRSV 分离物的分子变异很大, 但是关于 PRSV 的分子变异是否与其地理分布及症状表现有关, 以及 P 型和 W 型的分子区分特征还有待进一步研究。

关键词: 番木瓜环斑病毒, *cp* 基因, 分子变异, 多样性分析

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项项目(No. 200903034); 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)

*通讯作者: 吴祖建: wuzujian@126.com; 李凡: fanlikm@126.com

收稿日期: 2013-05-05; 接受日期: 2013-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

Occurrence and genetic biodiversity of Papaya ringspot virus in Yunnan

ZHU Jing¹ TAN Guan-Lin² BAO Gai-Li¹ LIU Fang¹ LI Xiao-Jing¹ WU Zu-Jian^{3*}
LI Fan^{1*}

(1. National Engineering Research Center for Agricultural Biodiversity Applied Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(2. Modern Education Technology Center, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(3. Fujian Province Key Laboratory of Plant Virology, Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] To determine the presence and genetic diversity of Papaya ringspot virus (PRSV) in Yunnan province. [Methods] Twenty-four symptomatic samples of *Carica papaya*, *Cucurbita moschata* and *Siraitia grosvenorii* were collected from 9 regions of Yunnan province in 2011 and 2012, and tested the presence of PRSV by RT-PCR. The amplicons of 940-bp covering partial coat protein (CP) and 3'-untranslated region (UTR) were cloned and sequenced. Pairwise comparisons and phylogenetic analysis were performed. [Results] PRSV was detected in 17 samples (70.8%), indicating the virus is common in Yunnan. Sequence analyses revealed the high genetic diversity among the isolates. [Conclusion] PRSV was detected in three different host crops in Yunnan province. Sequence analysis indicated a high genetic diversity among the isolates. Phylogenetic analyses indicated the existence of both PRSV groups, but further research is needed to reveal the correlation between molecular variations of PRSV and geographic regions or the symptoms PRSV causes.

Keywords: Papaya ringspot virus, *cp* gene, Molecular variance, Biodiversity analysis

番木瓜(*Carica papaya*)是番木瓜科番木瓜属植物,世界热带、亚热带地区均有分布。番木瓜果实营养十分丰富,富含人体所需的诸多营养成分^[1]。番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV)常造成番木瓜毁灭性损失,严重的可导致番木瓜85%–90%的减产,其引起的病害遍布全球番木瓜产区^[2-3]。除番木瓜外,PRSV还能侵染多种葫芦科植物,如南瓜、西瓜、黄瓜、丝瓜、王瓜和西葫芦等,在中国,PRSV已被证实还能侵染罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)^[4]。罗汉果主要分布在广西、江西和广东,云南有零星种植,是我国特有的珍贵葫芦科植物,素有良药佳果之称。南瓜(*Cucurbita moschata*)因产地不同,叫法各异,原产于北美州和澳洲,后传入中国,其种子和瓜蒂常入药^[5-6]。

番木瓜环斑病毒为马铃薯Y病毒科(Potyviridae)马铃薯Y病毒属(Potyvirus)的单分体正链RNA病毒,主要经种传和多种蚜虫以非持久

方式传播^[7]。马铃薯Y病毒属是植物病毒中最大的属之一,根据2012年出版的国际病毒分类与命名委员会(ICTV)第9次报告,马铃薯Y病毒属有146个确定种和32个可能的种,几乎占到已知植物病毒的20%^[8]。Potyviruses能侵染茄科、藜科、豆科、葫芦科、伞形科等多种植物,并造成重大经济损失^[9]。PRSV根据寄主范围分为两个株系:番木瓜环斑病毒番木瓜株系(Papaya ring spot virus type-P, PRSV-P)和番木瓜环斑病毒西瓜株系(Papaya ring spot virus type-W, PRSV-W)。PRSV-P主要侵染番木瓜,也可侵染葫芦科作物。PRSV-W侵染葫芦科作物11个属的38个种,藜科的2个种,一般认为不侵染番木瓜。目前国内外已有较多不同地理起源的PRSV分离物的报道,并有较多分离物已获得了全基因组序列信息,现有的序列信息表明PRSV不同分离物变异复杂,而且由于基因组序列的变异,一些检测PRSV的PCR引物仅对部分分

离物有效。

番木瓜、葫芦科蔬菜和罗汉果在云南种植面积较少,虽不是主要种植作物,但对边疆少数民族的脱贫致富仍然起到了重要的作用。而对云南 PRSV 引起的病害分布和损失情况并不清楚,为此有必要对云南 PRSV 病害开展调查。在此基础上,明确 PRSV 的分子变异特点,建立有效的快速检测技术,并应用于生产上,特别是番木瓜的苗木生产上。探讨 PRSV 的分子变异与其寄主来源和地域起源的相关性,将为有效防控该类病毒病提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 2011–2012 年采自云南昆明市、楚雄州、保山市、德宏州、西双版纳州、临沧市、玉溪市、红河州、文山州等地,包括番木瓜、南瓜以及罗汉果的发病叶片,症状表现主要为花叶、黄化、心叶脉明、皱缩、畸形等,经 Ha 等^[10]报道的 Potyviruses 通用引物 C1For (5'-GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC-3')和 C1Rev (5'-GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC-3')进行 RT-PCR 检测和基因测序确诊为 PRSV 后,−80 °C 冰箱保存备用。

M-MLV 反转录酶、TaKaRa Ex Taq、pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品,克隆菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α ,由本实验室保存。

1.2 PRSV 基因组 3'端扩增及克隆

染病材料的总核酸提取采用 Li 等的 CTAB 法^[11]。根据 NCBI 上已登录的 PRSV 序列设计扩增 PRSV 基因组 3'端的引物,即经 ClustalX 2 进行同源比对后,利用 Primer 5.0 设计扩增引物,并在线软件 Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)进行评估。设计的扩增引物为 PRSVC PF: 5'-CTAGCACAAAAA CTGGAGAGAG-3', PRSV3NR: 5'-CTCTCATTC YAAGAGGCTC-3'。第一链 cDNA 的合成按照 TaKaRa M-MLV RNase H[−] 逆转录试剂盒说明书进行。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应如下: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C

1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后,采用 TIANGEN 的 DNA 割胶回收试剂盒割胶纯化回收目标 DNA。纯化的目标 DNA 与 pMD18-T 载体连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选,并经 PCR 鉴定得到阳性克隆,分别选 3 个阳性克隆送深圳华大基因有限公司测序。

1.3 序列分析

测序结果经 DNASTar 软件剪切后,利用 NCBI 中的 BLAST 进行相似性比对,氨基酸及核苷酸序列比对利用 Pairwise sequence alignment 方法进行,通过 MEGA 5 构建 Neighbor-Joining 系统进化树,分析进化关系,本文所用样品的寄主、采集地及编号如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 云南 PRSV 病害的调查结果

本文对云南省 9 个市(州)进行 PRSV 病害的调查,发现这 9 个市(州)均有 PRSV 病害的发生,这 9 个市(州)分别为:昆明市、楚雄州、保山市、德宏州、西双版纳州、临沧市、玉溪市、红河州和文山州。PRSV 寄主包括番木瓜、南瓜和罗汉果,其中番木瓜的主要症状为叶片或果实上有环状斑点、花叶、皱缩畸形、褪绿斑驳和坏死;南瓜的主要症状为褪绿斑驳;而罗汉果的主要症状为叶片皱缩并有黄色斑点(图 1)。本文对云南 9 个市(州)的 16 个番木瓜、5 个南瓜和 3 个罗汉果样品经通用引物进行检测,发现有 12 个番木瓜、4 个南瓜和 1 个罗汉果感染 PRSV,发病率高达 71%。

2.2 云南 PRSV 的 RT-PCR 检测

利用检测引物 PRSVC PF/PRSV3NR,对云南昆明市、楚雄州、保山市、德宏州、西双版纳州、临沧市、玉溪市、红河州和文山州的 12 个番木瓜、4 个南瓜和 1 个罗汉果样品进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,从大部分样品中扩增到约 940 bp 的条带,与目标条带大小吻合,经克隆测序证实为 PRSV 的基因组 3'端序列。本文获得的基因片段如图 2 红色箭头标注部分,基因组 3'端包括部分 *cp* 基因和 3'端非编码区。

| 表 1 PRSV 分离物的寄主、采集地点及编号 | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Table 1 The hosts, collection locations and numbers of different PRSV isolates | | | |
| 编号 Number | 寄主 Host | 采集地点 Collecting locations | 登录号 Accession No. |
| ChinaYYJi-fmg | <i>Carica papaya</i> | Yuxi Yuangjiang, Yunnan | KF033081 |
| ChinaYHko1-fmg | <i>Carica papaya</i> | Honghe hekou, Yunnan | KF033093 |
| ChinaYHko2-fmg | <i>Carica papaya</i> | Honghe hekou, Yunnan | KF033094 |
| ChinaYHko3-fmg | <i>Carica papaya</i> | Honghe hekou, Yunnan | KF033095 |
| ChinaYJHo-fmg | <i>Carica papaya</i> | Xishuangbanna Jinghong, Yunnan | KF033088 |
| ChinaYZKa-fmg | <i>Carica papaya</i> | Lincang Zhenkang, Yunnan | KF033086 |
| ChinaYYXi-fmg | <i>Carica papaya</i> | Lincang Yunxian, Yunnan | KF033087 |
| ChinaYLYa2-fmg | <i>Carica papaya</i> | Baoshan Longyang, Yunnan | KF033089 |
| ChinaYLYa3-fmg | <i>Carica papaya</i> | Baoshan Longyang, Yunnan | KF033090 |
| ChinaYLYa4-fmg | <i>Carica papaya</i> | Baoshan Longyang, Yunnan | KF033091 |
| ChinaYLYa6-fmg | <i>Carica papaya</i> | Baoshan Longyang, Yunnan | KF033092 |
| ChinaYRLi-fmg | <i>Carica papaya</i> | Dehong Ruili, Yunnan | KF033079 |
| ChinaYYMo-fmg | <i>Carica papaya</i> | Chuxiong Yuanmou, Yunnan | KF033078 |
| ChinaYYJi-ng | <i>Cucurbita moschata</i> | Yuxi Yuanjiang, Yunnan | KF033085 |
| ChinaYJCh-ng | <i>Cucurbita moschata</i> | Yuxi Jiangchuan, Yunnan | KF033083 |
| ChinaYYSh-ng | <i>Cucurbita moschata</i> | Whenshan Yanshan, Yunnan | KF033084 |
| ChinaYCGo-lhg | <i>Siraitia grosvenorii</i> | Kunming Chenggong, Yunnan | KF033082 |

2.3 序列分析

2.3.1 PRSV 不同分离物部分 CP 氨基酸序列分析及其分子进化关系: 将测得的部分 cp 基因及 3'端非编码区剪切掉 3'端非编码区的 207 bp 核苷酸, 剩下的 731 bp 为部分 cp 基因, 编码 243 个氨基酸。比对分析发现, 本实验获得的部分 CP 氨基酸序列与 NCBI 上登录的 PRSV 国内外分离物的部分 CP 氨基酸一致性为 85%–100%, 其中来自西双版纳州景洪市的 PRSV 番木瓜分离物(ChinaYJHo-fmg)与其他 PRSV 分离物的氨基酸一致性最低, 仅为 85%–88%; 而来自昆明市呈贡县的罗汉果分离物(ChinaYCGo-lhg)和来自文山州砚山县的南瓜分离物(ChinaYYSh-ng)与来自河南的南瓜分离物(ChinaHenan-ng-DQ868880)的氨基酸一致性最高, 为 100%。

利用 MEGA 5 进行系统进化分析, 云南 17 个 PRSV 分离物可以分为 4 个簇, 其中来自西双版纳州景洪市的番木瓜分离物(ChinaYJHo-fmg)与来自玉溪市元江县的南瓜分离物(China YYJi-ng)各为一簇; 临沧市云县(ChinaYYXi-fmg)、临沧市镇康

县(ChinaYZKa-fmg)、德宏州瑞丽市(ChinaYRLi-fmg)、保山市隆阳区(ChinaYLYa2-fmg、ChinaYLYa3-fmg、ChinaYLYa4-fmg、ChinaYLYa6-fmg)、玉溪市元江县(China YYJi-fmg)以及楚雄州元谋县(ChinaYYMo-fmg)的番木瓜分离物为一簇; 而玉溪市江川县(China YJCh-ng)和文山州砚山县(ChinaYYSh-ng)的南瓜分离物、昆明市呈贡县的罗汉果分离物(China YCGo-lhg)与红河州河口县的番木瓜分离物(ChinaYHko1-fmg、ChinaYHko2-fmg、China YHko3-fmg)为另一个簇。选取本文获得的有代表性的云南 12 个 PRSV 分离物与其他已报道的国内外 PRSV 分离物基于部分 CP 氨基酸序列(243 aa)构建的系统进化树, 发现所用于分析的这些 PRSV 分离物可以分为 2 个组(图 3), 第 I 组分离物间的差异较第 II 组分离物间的差异大, 其中第 I 组分离物间氨基酸一致性为 85%–99%, 而第 II 组分离物间氨基酸一致性为 94%–100%。第 I 组全部为中国分离物主要由 2 个台湾分离物(Taiwan-sg-W-AY027810 和 Taiwan-fmg-P-DQ340770)及 9 个云南分离物组成, 9 个云南分离物包括本文

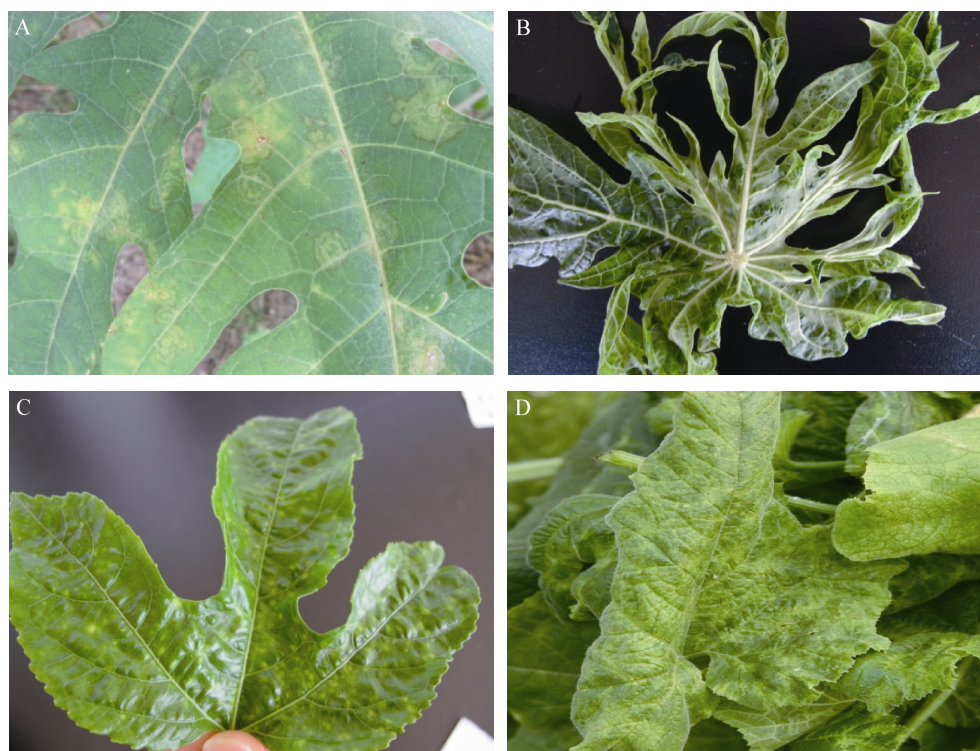


图 1 PRSV 在不同植物上的症状表现

Figure 1 Symptoms on different plants caused by PRSV

注: A、B: 番木瓜; C: 罗汉果; D: 南瓜。

Note: A, B: *Carica papaya*; C: *Siraitia grosvenorii*; D: *Cucurbita moschata*.

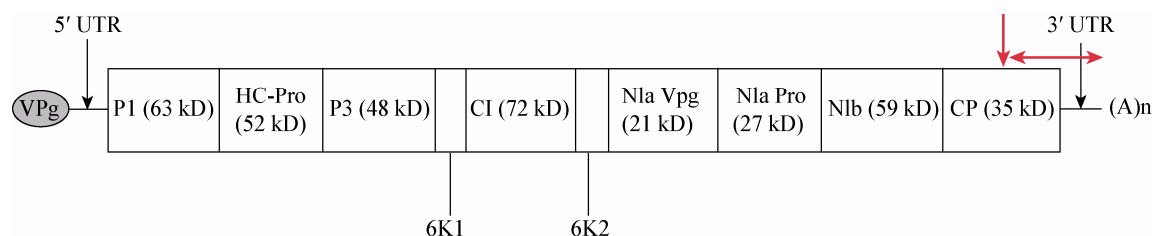


图 2 PRSV 的基因组结构

Figure 2 Genomic structure of PRSV

获得的 8 个云南分离物(ChinaYYJi-ng、ChinaYJHo-fmg、ChinaYRLi-fmg、ChinaYYMo-fmg、ChinaYLYa-fmg、ChinaYYJi-fmg、ChinaYZKa-fmg、ChinaYYXi-fmg)及杨国慧等^[12]报道的云南峨山分离物(ChinaYESh-ng-DQ449534); 2 个台湾分离物和 3 个云南分离物(ChinaYYJi-ng、ChinaYJHo-fmg 及 ChinaYESh-ng-DQ449534)变异较大, 相对较为独立。第 II 组的成员较为复杂, 包括目前已报道的亚洲(东亚、南亚和东南亚)、大洋

洲、南美洲及北美洲的分离物, 可以分成 5 个亚组, 来自巴西的两个西葫芦分离物(Brazil-xhl-W-DQ374152、DQ374153)与韩国的西瓜分离物(Korea-xg-AB369277)、中国海南番木瓜分离物(ChinaHN-fmg-P-EF183499)、缅甸的黄瓜分离物(Myanmar-hg-AB583209)、越南的南瓜分离物(VietNam-ng-AF506849)以及印度的番木瓜分离物(India-fmg-P-DQ666639)聚为第 1 亚组; 来自云南西双版纳的南瓜分离物(ChinaYBNa-ng-DQ449533)

与来自泰国的西葫芦分离物(Thailand-xhl-W-AY010722)聚为第 2 亚组; 来自菲律宾的番木瓜分离物(Philippines-fmg-P-AF506902)、墨西哥的番木瓜分离物(Mexico-fmg-P-AY231130)及泰国的番木瓜分离物(Thailand-fmg-P-AY162218)聚为第 3 亚组; 本文获得的云南河口番木瓜分离物(ChinaYHKo-fmg)与美国佛罗里达分离物(USAFlorida-P-AF196839)聚为第 4 亚组; 而本文获得的云南 ChinaYYSh-ng、ChinaYCGo-lhg 和 ChinaYJCh-ng 等 3 个分离物与来自日本、澳大利亚、美国、印度及越南的分离物聚为第 5 亚组。从图 3 可以看出, 中国的 22 个 PRSV 分离物均分布

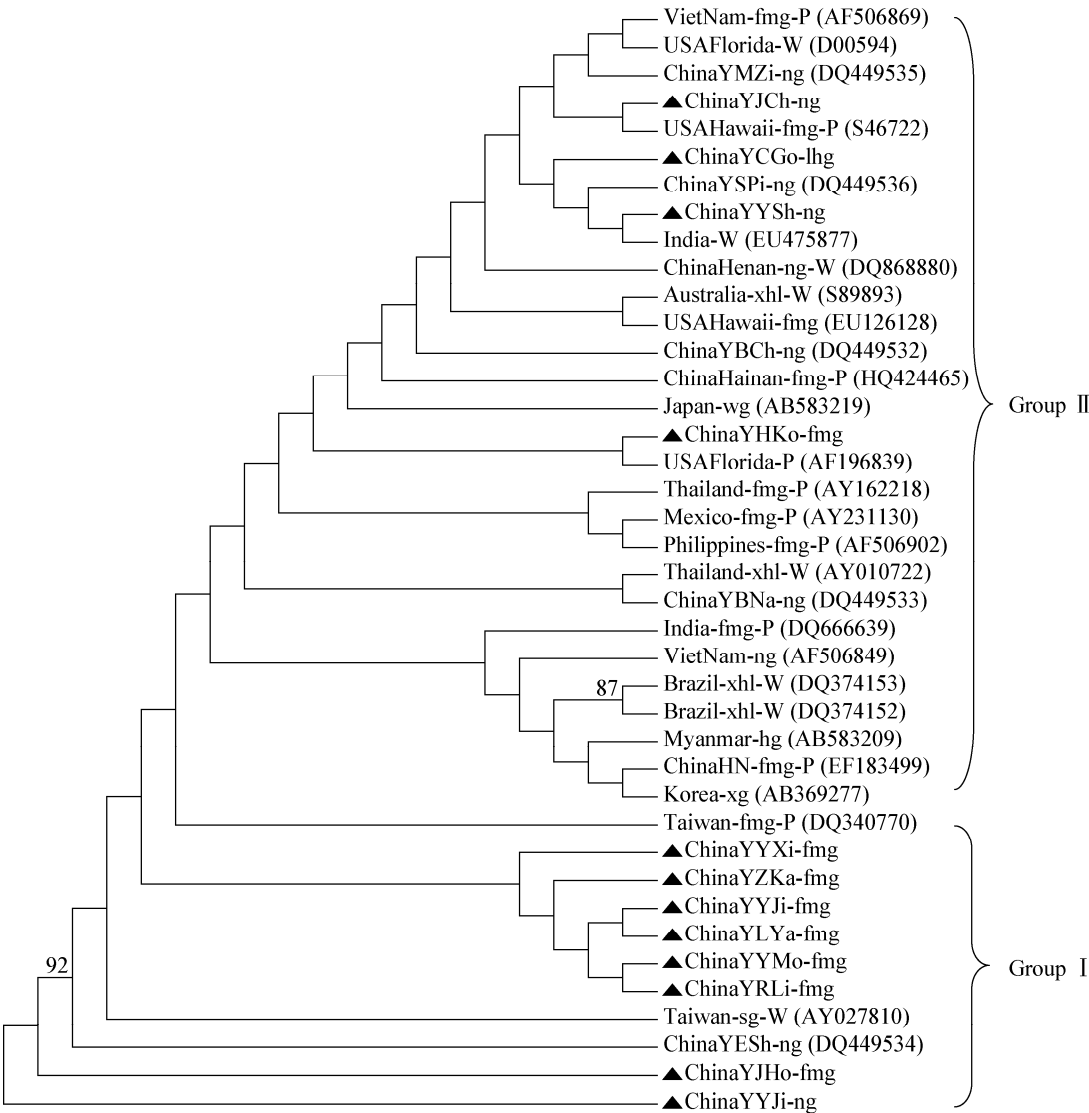


图 3 基于不同 PRSV 分离物外壳蛋白部分氨基酸序列构建的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the partial amino acid sequence of coat protein of PRSV different isolates

注: ▲: 本研究得到的分离物; fmg、ng、sg、lhg、xhl、hg、xg 和 wg: 番木瓜、南瓜、丝瓜、罗汉果、西葫芦、黄瓜、西瓜和王瓜。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; fmg, ng, sg, lhg, xhl, hg, xg and wg: *Carica papaya*, pumpkin, *Sponge gourd*, *Siraitia grosvenorii*, *Cucurbita pepo*, cucumber, watermelon and *Trichosanthes cucumeroides*, respectively. The numbers on branches represent the bootstrap values calculated with 1 000 replicates, and only values over 70% are shown.

于这 2 个组中,除第 II 组的第 3 亚组外,都有中国分离物分布;供分析的 17 个云南分离物有 9 个分布在第 I 组,其余的分布在第 II 组的第 2、4 和 5 亚组,表明 PRSV 云南分离物具有较为丰富的多样性,且各分离物之间没有明显的地理和寄主相关性。

2.3.2 PRSV 不同分离物基因组 3'端系统进化关系:对本文所获得的 17 个 PRSV 云南分离物的基因组 3'端(含 731 bp 的部分 *cp* 基因及 207 bp 的 3'端非编码区)核苷酸序列进行比对,结果表明,PRSV 云南不同分离物之间基因组 3'端核苷酸的同源率为 84%–100%,其中来自昆明市呈贡县的罗汉果分离物(ChinaYCGo-lhg)与来自文山市砚山县的南瓜分离物(ChinaYYSh-ng)的一致性最高,为 100%;而来自德宏州瑞丽市的番木瓜分离物(ChinaYRLi-fmg)与来自玉溪市元江县的南瓜分离物(ChinaYYJi-ng)的一致性最低,仅为 84%。另外,与国内外其他 PRSV 分离物的比较分析中发现,来自文山州砚山县的南瓜分离物(ChinaYYSh-ng)与来自中国台湾的丝瓜分离物(Taiwan-sg-W-AY027810)的一致性最高,高达 96.6%;而来自德宏州瑞丽市的番木瓜分离物(ChinaYRLi-fmg)与来自墨西哥的番木瓜分离物(Mexico-fmg-P-AY231130)的一致性最低,仅为 81%。结果表明云南瑞丽的番木瓜分离物(ChinaYRLi-fmg)在所有 PRSV 云南分离物中的变异最大。

利用 MEGA 5 构建的系统进化树中,总体上云南 17 个 PRSV 分离物可以分为 4 个簇,来自 ChinaYYMo-fmg 为一簇;ChinaYYJi-ng 为一簇;ChinaYZKa-fmg、ChinaYLYa2-fmg、ChinaYLYa3-fmg、ChinaYLYa4-fmg、ChinaYLYa6-fmg、ChinaYRLi-fmg、ChinaYHKo1-fmg、ChinaYHKo2-fmg、ChinaYHKo3-fmg、ChinaYYJi-fmg 以及 ChinaYYXi-fmg、ChinaYCGo-lhg 与文山和 ChinaYJCh-ng 为另一个簇;而 ChinaYJHo-fmg 为一簇。选取本文获得的有代表性的云南 12 个 PRSV

分离物与其他已报道的国内外 PRSV 分离物基于基因组 3'端核苷酸序列构建的系统进化树,发现这些分离物同样可以分为 2 个亚组(图 4),第 I 组全部为中国分离物,主要由本文获得的 8 个云南分离物(ChinaYYJi-ng、ChinaYYMo-fmg、ChinaYJHo-fmg、ChinaYYXi-fmg、ChinaYZKa-fmg、ChinaYYJi-fmg、ChinaYLYa-fmg、ChinaYRLi-fmg)与 2 个中国海南分离物(ChinaHN-fmg-P-DQ419573、EF183499)及地理来源和寄主不详的中国分离物(China-X96538)组成,其中 ChinaYYJi-ng、ChinaYYMo-fmg、ChinaYJHo-fmg 和 ChinaHN-fmg-P-EF183499 相对较为独立。第 II 组成员包括来自大洋洲、南美洲、北美洲和亚洲分离物,可以划分成 6 个亚组,各亚组内的成员具有一定的地理相关性,来自缅甸的黄瓜分离物(Myanmar-hg-AB583209)和印度的番木瓜分离物(India-fmg-P-DQ666639)聚为第 1 亚组,来自中国台湾的 4 个分离物(Taiwan-sg-W-AY027812、Taiwan-fmg-P-JX448373、Taiwan-fmg-P-DQ340770 及 Taiwan-sg-W-AY027810)与韩国的西瓜分离物(Korean-xg-AB369277)聚为第 2 亚组,本文获得的云南 3 个葫芦科分离物(ChinaYYSh-ng、ChinaYCGo-lhg 和 ChinaYJCh-ng)聚为第 3 亚组,第 4 亚组包括泰国的 2 个分离物(Thailand-xhl-W-AY010722 和 Thailand-fmg-P-AY162218)及日本的王瓜分离物(Japan-wg-AB583219),第 5 亚组包括 2 个中国分离物即本文获得的云南河口番木瓜分物(ChinaYHKO-fmg)以及来自海南的番木瓜分离物(ChinaHainan-fmg-P-HQ424465),来自美国的两个分离物(USAHawaii-fmg-P-S46722 和 USAFlorida-W-D00594)、两个巴西分离物(Brazil-xhl-W-DQ374152、DQ374153)、墨西哥分离物(Mexico-fmg-P-AY231130)、澳大利亚分离物(Australia-xhl-W-S89893)以及印度分离物(India-W-EU475877)聚为第 6 亚组,云南分离物主要分布于第 3 和 5 亚组。从图 4 可以看出,PRSV 亚洲分离物比美洲和大洋洲分离物具有更复杂的

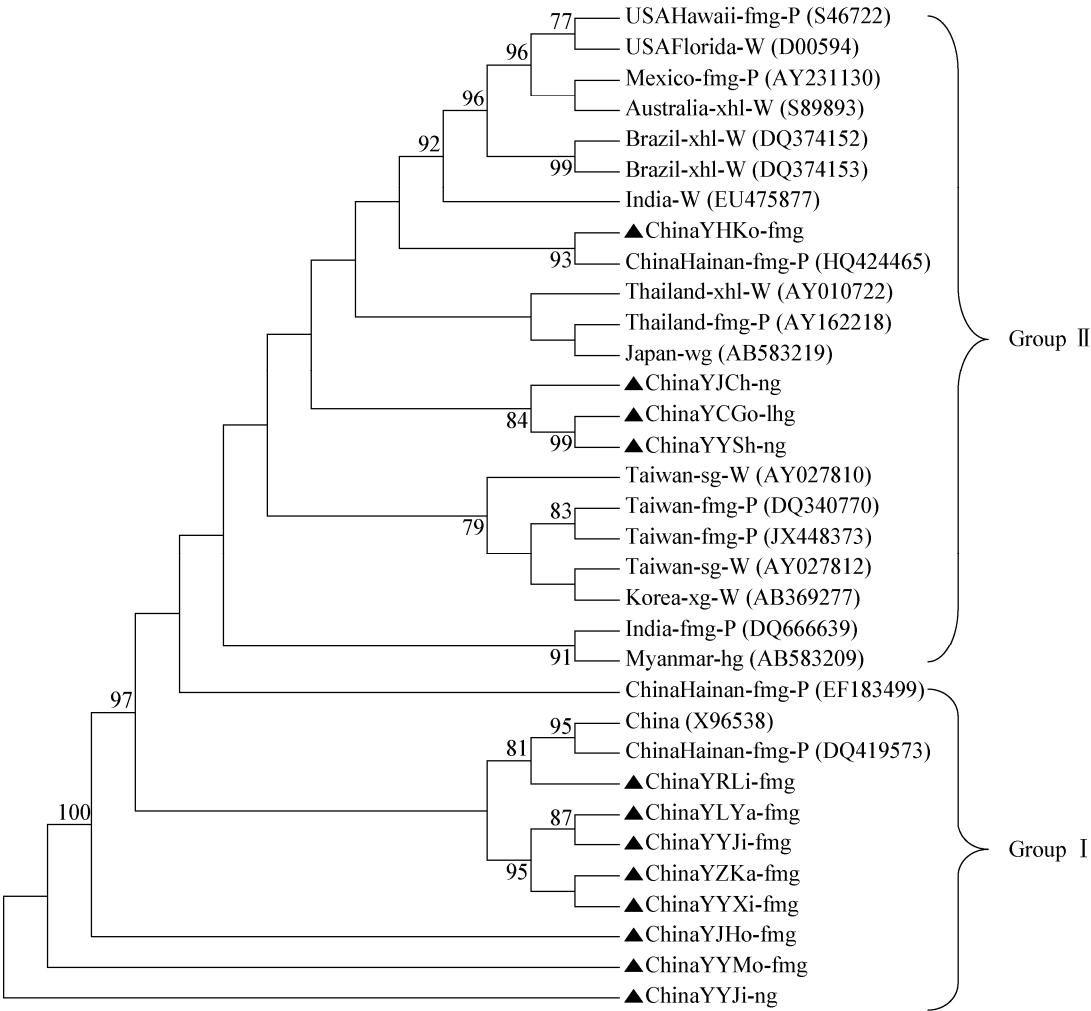


图 4 基于不同 PRSV 分离物基因组 3'端核苷酸序列构建的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of 3' end of the genome of different PRSV isolates

注: ▲: 本研究得到的分离物; fmg、ng、sg、lhg、xhl、hg、xg 和 wg: 番木瓜、南瓜、丝瓜、罗汉果、西葫芦、黄瓜、西瓜和王瓜。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; fmg, ng, sg, lhg, xhl, hg, xg and wg: *Carica papaya*, pumpkin, *Sponge gourd*, *Siraitia grosvenorii*, *Cucurbita pepo*, cucumber, watermelon and *Trichosanthes cucumeroides*, respectively. The numbers on branches represent the bootstrap values calculated with 1 000 replicates, and only values over 70% are shown.

多样性, 亚洲分离物分布于各个组和亚组中, 而来自美国、墨西哥、澳大利亚和巴西的美洲及大洋洲分离物仅分布于第 II 组的第 6 亚组。中国台湾的 4 个分离物、泰国的 2 个分离物、美国的 2 个分离物和巴西的 2 个分离物均各自聚在同一簇, 即除中国大陆分离物和印度分离物外, 其他地区的 PRSV 分离物在进化上与其地理来源有明显的相关性。另外, 基于 PRSV 基因组 3'端构建的进化树无法将 P 型和 W 型分开, 如美国的 USAHawaii-fmg-P-S46722 和 USAFlorida-W-D00594 分离物, 泰国的 Thailand-xhl-W-AY010722 和 Thailand-fmg-P-AY162218 分离物以及中国台湾的 Taiwan-sg-W-AY027812、Taiwan-fmg-P-JX448373、Taiwan-fmg-P-DQ340770 及 Taiwan-sg-W-AY027810 分离物各

自均分布在同一地理来源组成的亚组中(图 4)。

3 讨论

众多资料表明, PRSV 的 *cp* 基因 5'端碱基及其编码的 N 端氨基酸变异较大, 而位于 3'端的碱基及其编码的 C 端氨基酸则相对保守^[2,12-15], 说明 CP 的 N 端可能属高突变区域。古勤生等认为, PRSV CP 氨基端 KE 基序重复数存在很多差异, 这可能是造成 *cp* 核苷酸在长度上差异的主要原因, 而 N 端其他位置却相当保守, 尤其是 DAG 基序及附近序列^[14]。PRSV CP 的 C 端序列可能与其功能有着密切的关系, 而 N 端序列可能仅具备结构方面的作用^[13-14]。为此, 为了能更好地扩增获得所有云南供试材料中 PRSV 分离物的 *cp* 基因, 我们在设计扩增引物时避开了 *cp* 基因氨基酸 N 端的高度变异区。本文所获得的 PRSV 分离物经与其他已报道的 PRSV 分离物进行的多序列比对, 结果显示这些分离物的 CP 前 87 个氨基酸变异较大, 尤其是前 21 个氨基酸变异最大, 有些分离物有氨基酸缺失, 如云南玉溪市元江县的南瓜分离物 (ChinaYYJi-ng) 缺失了一个氨基酸; 第 88 氨基酸以后的氨基酸变异较小, 在变异较小的区域内, 有 100 个氨基酸序列完全一致。通过缺少部分 N 端氨基酸的 CP 氨基酸序列(含 243 aa)系统进化树比对结果并未显现出各分离物之间明显的地理相关性, 也无法区分出 PRSV 的 P 型和 W 型。杨国慧等通过对国内外 PRSV-P 和 PRSV-W 两个株系的 *cp* 基因核苷酸序列进行同源性比较, 发现 PRSV 外壳蛋白基因核苷酸序列在两个株系间差异不大, 而与分离物来源的地理位置有关, 地理位置差异越大, PRSV 外壳蛋白基因核苷酸序列差异也越大^[12]。Bateson 等认为, PRSV 的 P 株系是由 W 株系突变而来, 就 *cp* 基因而言, P 株系和 W 株系的亲缘关系远较与其他株系的近, 且在 P 和 W 株系中并未发现能够区别它们寄主范围差异的特征序列^[15]。因此, 本文获得的这些云南分离物仅根据 PRSV 的基因组 3'端序列无法确定是否存在 P 株系和 W 株

系, 需通过生物学接种确定寄主范围及症状类型来鉴定其株系类型。本文获得的 938 bp 从部分 *cp* 基因到 3'端非编码区的 PRSV 基因组 3'端核苷酸序列显现了一些分离物明显的地理相关性, 但部分 CP 氨基酸(243 aa)序列分析结果却未显现各分离物之间明显的地理相关性, 因此通过 PRSV 序列差异来区分 PRSV 的地理种群或来源, 值得进一步分析和探讨, 而要将 P 和 W 两种株系截然分开也必须结合其它方法如寄主反应等来综合分析。

根据遗传距离构建的系统发育树分析, 发现云南 PRSV 分离物与亚洲其他地区 PRSV 分离物可能有共同的起源, 这些分离物在发育树上先分支, 说明亚洲分离物极有可能是最早起源的。而印度的两个 PRSV 分离物中除 India-fmg-P-DQ666639 与亚洲分离物更近外, 另一个分离物 India-W-EU475877 却与美洲和大洋洲的分离物很近, 可能美洲或大洋洲分离物与亚洲分离物间发生了重组^[16]。总体而言, 美洲和大洋洲的 PRSV 分离物与亚洲分离物的分化与其地理分布有一定的相关性, 可能在病毒进化过程中, 由于地理隔离和人为传播导致不同地区的病毒进化出不同的特点。另外, 系统发育树也显示, PRSV 的进化方向与 P 型和 W 型无明显相关性。云南的 PRSV 分离物没有出现明显的聚集成簇的现象, 而是分成好几簇, 尤其是来自西双版纳景洪市的番木瓜分离物 (ChinaYJHo-fmg) 和玉溪市元江县的南瓜分离物 (ChinaYYJi-ng) 分子变异最大, 与其他云南分离物的一致性低于 90%。由于云南地处云贵高原, 加之独特的生态环境, 与外界形成了一定的地理隔离, 在长期的选择压力下, 有可能形成了独特的地理种群, 但由于人为的种苗调运和病毒传播介体的迁飞传播, 使云南分离物得以扩散到其他区域, 然后在当地定殖下来。类似现象在水稻条纹病毒 (Rice stripe virus, RSV)^[17] 和水稻黄化斑驳病毒 (Rice yellow mottle virus, RYMV) 的研究中也被报道^[18]。

蔡建和等^[19]根据 PRSV 在西葫芦上表现不同的症状特点, 将其分为 4 个不同的株系, 即 Ys (褪绿黄点和轻花叶)、Vb (沿叶脉变灰白色)、Sm (重型花叶) 和 Lc (叶片卷曲), 其中 Ys 为优势株系。但在田间条件下, 番木瓜很可能复合感染几个不同的株系, 利用血清学和生物学方法很难快速和有效地鉴别出来。本文获得的 PRSV 分离物在番木瓜上表现的症状也不尽相同, 如有的病样为叶片或果实环斑、有的为叶片斑驳及花叶, 有的为叶片畸形等, PRSV 在同一种寄主上产生的致病性差异是否与其基因组的分子变异有关, 值得进一步研究。

致谢: 特别感谢云南省热带作物科学研究所的蒋桂芝、云南省临沧市植保植检站的杨子林、云南省德宏州芒市植保植检站的任国敏、云南省普洱市质量技术监督综合检测中心的刘新月、云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所的龙亚芹和王万东以及云南省农业科学院热区生态农业研究所的杨子祥等老师在样品收集中给予的大力支持!

参 考 文 献

- [1] Mikhalechik EV, Ivanova AV, Anurov MV, et al. Wound-healing effect of papaya-based preparation in experimental thermal trauma[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2004, 137(6): 560-562.
- [2] 魏军亚, 刘德兵, 蔡群芳, 等. 7种番木瓜环斑病毒分离株外壳蛋白基因的克隆与序列比较[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(4): 1-5.
- [3] 黄江华, 黄嘉薇, 张建军, 等. 番木瓜环斑病毒研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3257-3259.
- [4] Liao YM, Gan XJ, Chen BS, et al. First report of Papaya ringspot virus and Zucchini yellow mosaic virus in Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) in China[J]. Plant Disease, 2005, 89(5): 530.
- [5] 赵一鹏, 李新峥, 周俊国. 世界南瓜生产现状及其种群多样性特征[J]. 内蒙古农业大学学报, 2004, 25(3): 112-115.
- [6] 李新峥, 杨鹏鸣, 刘振威, 等. 中国南瓜主要性状遗传特性的研究[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(1): 7-10.
- [7] 饶雪琴, 李华平. 转基因番木瓜研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004(6): 38-42.
- [8] King AM, Adams MJ, Carstens EB, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. San Diego: Academic Press, 2012.
- [9] Silvio UI, Anne LH, Bernardi F, et al. Potyvirus proteins: a wealth of functions[J]. Virus Research, 2001, 74: 157-175.
- [10] Ha C, Coombs S, Revill PA, et al. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses[J]. Archives of Virology, 2008, 153(1): 25-36.
- [11] 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.
- [12] 杨国慧, 张仲凯, 崔崇士. 番木瓜环斑病毒南瓜分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 植物保护学报, 2007, 34(3): 273-276.
- [13] 卢雅薇, 沈文涛, 唐清杰, 等. 番木瓜环斑病毒海南分离物全基因组结构分析[J]. 广东农业科学, 2007(9): 54-58.
- [14] 古勤生, 田延平, 彭斌, 等. 基于外壳蛋白基因序列对3种葫芦科作物病毒的分子分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 357-363.
- [15] Bateson MF, Henderson J, Chaleeprom W, et al. Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type P[J]. Journal of General Virology, 1994, 75(Pt12): 3547-3553.
- [16] Lu YW, Shen WT, Zhou P, et al. Complete genomic sequence of a PRSV isolate from Hainan Island, China[J]. Archives of Virology, 2008, 153(5): 991-993.
- [17] Wei TY, Yang JG, Liao FL, et al. Genetic diversity and population structure of Rice stripe virus in China[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(4): 1025-1034.
- [18] Zakia A, Fadhila AP, Oumar T, et al. Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa[J]. Journal of General Virology, 2003, 84(Pt3): 733-743.
- [19] 蔡建和, 范怀忠. 华南番木瓜病毒及环斑病毒株系的调查鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(4): 13-17.