



黑龙江马铃薯Y病毒P1基因的特点

韩树鑫¹, 白艳菊^{2*}, 张俊华^{1*}, 高艳玲^{1,2}, 张威^{1,2}, 范国权², 张抒², 邱彩玲^{1,2}, 贺振³

¹ 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

² 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086

³ 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】本研究通过对不同PVY分离物基因的测序及分析, 从而了解PVY株系的多样性, 进而对PVY病毒的分子检测及防治提供重要的资料和参考。【方法】本研究针对黑龙江15个马铃薯Y病毒样品的P1基因进行克隆测序和进化树分析。【结果】经比对分析, 样品被分成两组, 有10个样品的基因类型高度同源, 且相对保守, 是本地区的优势群组, 无论是与国内其它地区样品比较还是与国外样品比较, 其亲缘关系都有一定距离; 而另一组中的5个样品的P1基因与本地优势组群有较大差异, 且这5个样品间也有一定的差异, 并与国内其它地区和国外一些样品的P1基因序列比较接近。通过比对GenBank中已上传的序列提供的PVY株系的信息, 得知本次试验的P1基因与PVY^{NTN-NW}株系是相似的, 且这15个样品与国内其他样品一样都是由PVY^N株系演变而来。【结论】由P1基因分析表明, PVY受环境影响较大, 黑龙江10个样品的PVY在长期的进化中产生了具有地方特点的变化, 而后来的5个样品说明中国大部分PVY有可能是跟随国外品种资源的引进进入, 同时PVY也随国内不同区域间资源交流和种薯调运而传播。

关键词: 黑龙江, 马铃薯Y病毒, P1基因

马铃薯病毒病对马铃薯质量和产量所造成的危害是极为严重的^[1], 其中马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)是最常见且危害性最大的病毒之一^[2-4]。PVY是1种单链正义RNA病毒, 其基因组长约9.7 kb, 属于马铃薯Y病毒属(Potyvirus)。感染马铃薯的

PVY病毒主要可分为PVY^O、PVY^C、PVY^N、PVY^Z和PVY^E 5个株系^[5]。PVY病毒引起的症状主要有花叶和坏死, 最初报道认为引起坏死的株系为PVY^N, 但通过对病毒进化及PVY^N株系的基因序列研究发现, PVY^N株系已经发生很多变化, 进

基金项目: 国家现代农业马铃薯产业技术体系 (CARS-10-P14); 哈尔滨市科技创新人才专项资金(2015RQQYJ031)

*通信作者。E-mail: 白艳菊, yanjubai@163.com; 张俊华, Podozjh@163.com

收稿日期: 2015-08-31; 修回日期: 2016-02-03; 网络出版日期: 2016-03-02

一步被分为欧洲型(PVY^N)及北美型(NA-PVY^N)两类^[6]。近年来的研究普遍认为,马铃薯生产中主要有PVY^O和PVY^N,以及二者重组衍生的新的株系,并且危害较重^[4],而PVY^C、PVY^Z和PVY^E株系发生鲜有报道,在生产中几乎消失,所以其对生产的危害较小^[5,7-9]。

基因重组在PVY的进化过程中是一种重要而有效的手段,现已经发现了多种经基因重组后产生的新的PVY株系,如PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi}, PVY^{NTN-NW}^[10-12]。从目前田间检测及研究来看, PVY^{N-Wi}株系可以侵染很多的马铃薯品种,但在症状的表现上却没有PVY^N严重,有些受侵染的植株甚至没有症状表现^[13-14]。而PVY^{NTN}则可以导致具有PVY敏感性的马铃薯品种产生块茎坏死症状^[15]。PVY^{NTN}及PVY^{N-Wi}分别发现于匈牙利和波兰^[16],但在很短的时间内,在其它地区的地块中,2种株系已被同时检出^[9,11,14,17-20],这表明许多因素能导致这2个株系的病毒传播,并且病毒的传播速度极快。PVY基因组中不同基因的遗传变异呈现多样化,如:突变、缺失、插入、重组等, PVY常发生重组区域为P1、N1b、HC-Pro和CP等。P1在基因组中是变异性较大的蛋白,其只有C端相对保守^[21],研究表明, P1可能参与病毒的运动^[22],与病毒复制相关蛋白(CI、VPg、NIa-Pro和N1b)存在互作^[23],并且与寄主症状表达相关^[24]。目前, P1基因区的重组可分为2类,一类为由PVY^O和PVY^N株系重组而来^[16],另一类为P1基因区发生连续几个基因的移位或突变^[25]。PVY^{NTN}和PVY^{NTN-NW}2种类型的重组株系中,均按其基因序列中含有PVY^N或PVY^O株系的P1段重组序列而被分为A型或B型^[16]。

黑龙江省是我国马铃薯主产区之一,且是重要的种薯输出省份,种薯质量对全国马铃薯生产有直接的影响。虽然近年来在马铃薯生产中对PVY的防控措施在逐步提升,但由于PVY病毒可以通过蚜虫非持久性快速传毒,从而导致PVY在

田间依然大量存在。本试验通过对马铃薯PVY的P1基因区进行研究,通过对PVY的P1基因区域序列的扩增,可进一步地了解黑龙江省马铃薯PVY株系的类型和分布,进一步为马铃薯PVY的对症防控和抗病育种提供重要的理论支持。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

试验所用的各种酶制剂、dNTPs、样品中总RNA提取试剂(Trizol)分别购自宝生物工程(大连)有限公司、Promega公司和Invitrogen公司。

1.2 样品来源

本研究所使用的样品由田间采集于黑龙江地区带有如脉坏死、重度花叶、斑块等明显PVY症状的马铃薯样品,经ELISA鉴定PVY为阳性,筛选出15份提供用于本试验,置于-80℃冰箱中保存(表1)。

1.3 PVY检测引物及P1基因扩增引物的选择

由于PVY的CP基因在不同的PVY株系中具有高度保守性,所以根据GenBank已公布的PVY常见株系CP基因的序列保守区,设计用于扩增CP基因的引物,引物预期扩增的目的片段大小为427 bp。马铃薯PVY的P1基因区重组及突变较多,对P1基因区的扩增使用的引物^[26],位于5'-UTR(5'端非编码区)区中的保守区域。PCR扩增目的片段为1097 bp,包含5'-UTR区和完整的P1基因区域(表2)。

1.4 样品的总RNA提取及cDNA的制备

使用Trizol试剂法提取马铃薯病叶中的总RNA,提取方法参照试剂盒说明书。总RNA提取完成后,利用Promega公司生产的M-MLV进行逆转录合成cDNA第一链。

1.5 PCR扩增及PVY检测

利用双重RT-PCR方式进行PVY检测及cDNA质量检测使用的引物见表2。PCR扩增采用25 μL

表1. 样品的PVY P1基因序列与GenBank中参照序列

Table 1. The PVY P1 sequence of samples and reference in GenBank

GenBank ID	From	Year	This study isolate
R051220	Harbin, China(哈尔滨)	2009	7-2
KR051219	Keshan, China(克山)	2009	8-8
KR051218	Keshan, China(克山)	2010	9-4
KR051217	Harbin, China(哈尔滨)	2010	30-2
KR051209	Harbin, China(哈尔滨)	2008	C-239
KR051221	Harbin, China(哈尔滨)	2011	C-429
KR051210	Harbin, China(哈尔滨)	2011	C-433
KR051214	Ningan, China(宁安)	2008	NA3
KR051207	Keshan, China(克山)	2009	32-8
KR051208	Keshan, China(克山)	2013	32-18
KR051212	Keshan, China(克山)	2012	C-827
KR051213	Keshan, China(克山)	2012	C-860
KR051215	Binxian, China(宾县)	2013	XJ 6-4
KR051216	Gannan, China(甘南)	2010	ZS5
KR051211	Huma, China(呼玛)	2012	C-533
GU074001	Heilongjiang, China(黑龙江)	2008	-
EU675327	Shanxi, China(陕西)	2008	-
EU675325	Xinyang, China(信阳)	2008	-
KF722821	Fujian, China(福建)	2011	-
JF911803	Guizhou, China(贵州)	2010	-
KF722841	Fujian, China(福建)	2011	-
FJ766536	Keshan, China(克山)	2008	-
EU675326	Zhengzhou, China(郑州)	2008	-
FJ423030	Caohai, China(草海)	2008	-
FJ423029	Guiyang, China(贵阳)	2008	-
GU074002	Dalian, China(大连)	2008	-
FJ423028	Lushi, China(卢氏)	2008	-
AJ315746	Russia	2001	-
AJ315741	Canada	2001	-
AJ315745	Canada	2001	-
AY745495	Canada	2005	-
AJ315744	USA	2001	-
AJ315742	USA	2001	-
AY166867	Canada	2003	-
X97895	Swiss	1996	-
AF401609	North America	2002	-
AF401607	North America	2002	-
AF401600	North America	2002	-
AF401604	Slovenia	2002	-
AJ315739	Slovenia	2001	-
AB461455	Syria	2002	-
KF184653	Serbia	2011	-
AJ315738	Denmark	2001	-
AJ315747	England	2001	-
AJ315740	Ukraine	2001	-
EF026074	USA	2006	-
AJ315743	Scotland	2001	-
AB461487	Syria	2004	-
AB461459	Syria	2006	-
JQ924288	Brazil	2007	-

表2. 本研究中所使用的引物

Table 2. The primers used in this study

Primer	Sequences (5'→3')	Size/bp	References
M40-5'	GGATCCAATTAACAA CTCAATA	1097	[26]
NTN-R	CATTTGTGCCCAATTGCC		
NAD5-F	CTCCAGTCACCAACATTG GCATAA	140	[27]
NAD5-R	GATGCTTCTGGGGCTTC TTGTT		
PVY-F	GGCATAACGGACATAGGA GAAACT	427	[19]
PVY-R	CTCTTTGTGTTCTCCTCTT GTGT		

反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (2.5 mol/L) 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.25 μL, PVY-CP-F (10 μmol/L) 1 μL, PVY-CP-R (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 16 μL, rTaq (5 U/μL) 0.25 μL, cDNA 2 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55.5 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共30个循环; 72 °C 7 min。PCR 反应结束后取反应产物5 μL, 利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 P1基因区的扩增及克隆

PCR扩增采用Touch down PCR方法, 使用25 μL 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (2.5 mol/L) 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μL, PVY-CP-F (10 μmol/L) 1 μL, PVY-CP-R (10 μmol/L) 1 μL, rTaq (5 U/μL) 0.25 μL, ddH₂O 13.75 μL, cDNA 2 μL。PCR反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 90 s, 5个循环; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 5个循环; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 10个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共10个循环; 最后一轮循环后72 °C 10 min。PCR反应结束后取反应产物5 μL, 利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物纯化后克隆至pMD18-T载体上, 并转化至DH5α感受态细胞中。经菌落PCR鉴定获得阳性重组质粒, 随机选择其中阳性克隆子并委托华大基因测序, 通过测序峰图及序列比对分析排除由PCR扩增引起的突变。

1.7 序列分析及系统进化树的绘制

通过克隆测序后得到的序列,使用Bio Editer、DNAMAN等软件进行进一步的序列分析,从而了解序列的多态性差异。另外,从GenBank选取目前已知株系的PVY P1基因序列作为参考,利用ClustalX进行建树序列多重比对,得到的结果使用Gblock裁去冗余序列,利用MrModeltest 软件进行建树序列最适合的核苷酸替换模型的分析,使用MAGA 6.0 软件进行进化树分析,以确定样品与已知各个不同PVY株系间的遗传关系。使用ML方法对所得的序列进行进化树分析,以确定不同样品中马铃薯PVY之间的相互关系。

1.8 序列重组检测

测序获得的序列,经过BioEdit和ClustalX比对分析,去除gap,进而通过RDP 4.46软件中的RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MAXCHISISCAN、CHIMAERA、3SEQ等方法进行重组分析。

2 结果和分析

2.1 PCR检测结果

用针对CP基因的序列引物和仅针对马铃薯NAD5基因的引物对15份样品进行RT-PCR检测,并对产物进行测序,测序结果表明,受PVY侵染的样品可以同时扩增出约400 bp和150 bp的产物,而阴性对照样品只能扩增出约150 bp的产物(图1),初步说明样品感染了PVY。

2.2 P1基因的扩增

使用Touch down PCR方法对样品中PVY P1部分基因序列进行扩增,扩增后的PCR产物大小约为1100 bp (图2),扩增后的PCR产物使用胶回收试剂盒进行回收,对回收产物进行克隆测序。

2.3 P1基因的序列分析

测序和序列比对表明,样品的基因序列可被分为2组,其中一组为7-2、8-8、9-4、30-2和2011-C-433等5个样品,占试验所用样品数量的三

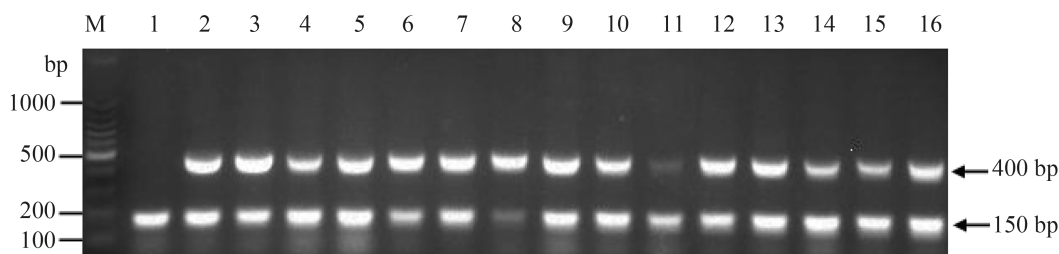


图 1. PVY病毒的PCR检测结果

Figure 1. The results of PCR detection for PVY. M: DNA Marker; lane 1: negative control; lane 2–16: detection of PVY samples.

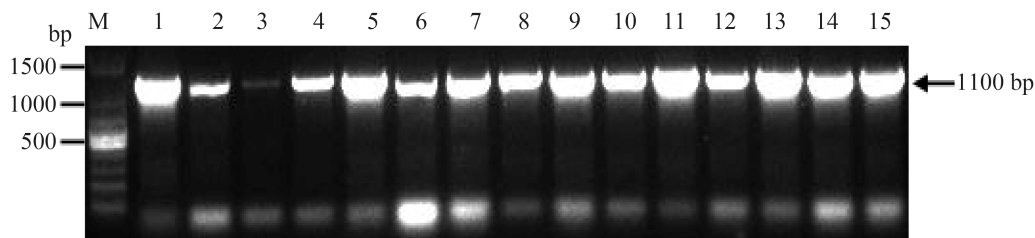


图 2. PVY分离物P1基因PCR扩增产物

Figure 2. Detection of PCR product of P1 gene from PVY isolates. M: DNA Marker; lane 1–15: the P1 genes of different samples were amplified by PCR.

分之一, 它们的基因序列一致率较高, 而由剩余三分之二的样品组成的第2组, 它们的基因一致率同样较高, 仅有部分单个碱基发生突变。两组组间基因一致率为95.79%。

2.4 与已报道马铃薯PVY P1基因序列的进化分析

利用ClustalW进行建树序列多重比对, 经比对后序列长度为823 bp。将比对后的序列, 使用Gblock 裁去冗余序列后得到长度为794 bp的序列保守区。使用MrModeltest 软件进行建树序列最适合的核苷酸替换模型的分析, AIC标准中模型为GTR+I+G。使用ML法建立的系统发育树(bootstrap为1000)如图3所示, 将15个样品与GenBank中筛选的23个其他国家和国内已报道的12个明确地点的PVY病毒P1基因序列一同构建进化树相比较, 进一步对测序样品进行分析。将GenBank中已知分离物P1序列, 与本次实验中测定的分离物P1序列进行进化树分析, 得到的进化树如下, 从其中我们可以发现, 所有的分离物序列被分为2个大的组, 我们将它们称为S1, S2组, S1组中的分离物数量要远大于S2组中。这2个组中, S1组内又可分为3个亚组(亚组A, B, C), 而来自于中国的高度集中于亚组A, C中, 亚组B中来自于我国的分离物仅有1个, 其中8-8、30-2、2011-C-433等5个样品与陕西、贵州、福建、河南等地的样品分在A组, 而其余样品与福建和辽宁样品则被分在C组, 两组距离较远。B组样品仅有英国、加拿大、美国、俄罗斯和一个中国贵州的样品。C组样品同源性, 说明黑龙江样品具有明显的地域特征。中国马铃薯跨省引种和种薯调运自由度很高, 以及PVY本身易变异的特性, 所以会有8-8、30-2、2011-C-433等少量样品P1基因比本研究大部分样品具有更复杂的变化情况存在。另外, 所有试验中检测的样品均与PVY^N株系相关A组的序列被分为一类, B组没有本试验样

品, 说明试验样品的株系更接近PVY^N, 与SYR-III和PVY^O无关。其中8-8、30-2、2011-C-433等5个样品被分到A组, 其余分在C组, 与序列比对结果一致。进化树进一步分析证明了, 中国PVY P1基因的丰富性, 同时又有很明显的地域特征。

2.5 重组分析

通过RDP 4.46软件的重组分析, 结果发现在15个PVY分离物中共检测到5个显著的重组体, 4个重组位点, 分别位于P1基因的277、312、329和662处(图4)。这5个重组体可形成4种重组模型, 且其参考亲本相同, 一个来源于本实验分离的2012-C-827, 另一个来源于GenBank中的N-Jg (AY166867)分离物(图4)。其中, 2012-C-433为代表的在277 bp处有一个重组位点的O:N型, 以9-4和7-2为代表的在312bp处有一个重组位点的O:N型, 以8-8为代表的在329bp处有一个重组位点的O:N型, 以及以30-2为代表的312 bp和662 bp处2个重组位点N:O:N型。

3 讨论

近年来, 我国对PVY株系的研究随国际相关研究的发展而引起一些科研人员的兴趣, 中国国土面积大, 环境资源丰富, 气候多样, PVY是公认的遗传多样化的病毒种类, 各产区PVY是否有共性的研究是非常有必要的。国内针对PVY的研究报道很多, 取得了一些有意义的结果, 张帅等对贵州1株PVY坏死株系的全序列进行了分析, 发现其与PVY^{NTN-NW}株系亲缘关系较近^[28]。郭兴启和李鹏对我国的PVY^N株系进行了鉴定, 并通过克隆其CP基因, 研究了转CP基因的烟草对PVY产生的抗病性^[29-30]。P1基因研究是PVY研究比较重要的内容, 大部分PVY株系的重组和突变都发生在P1基因区域, 不同的株系或者相同株系的不同亚型, 其在基因水平上的差异也主要来源于P1基因

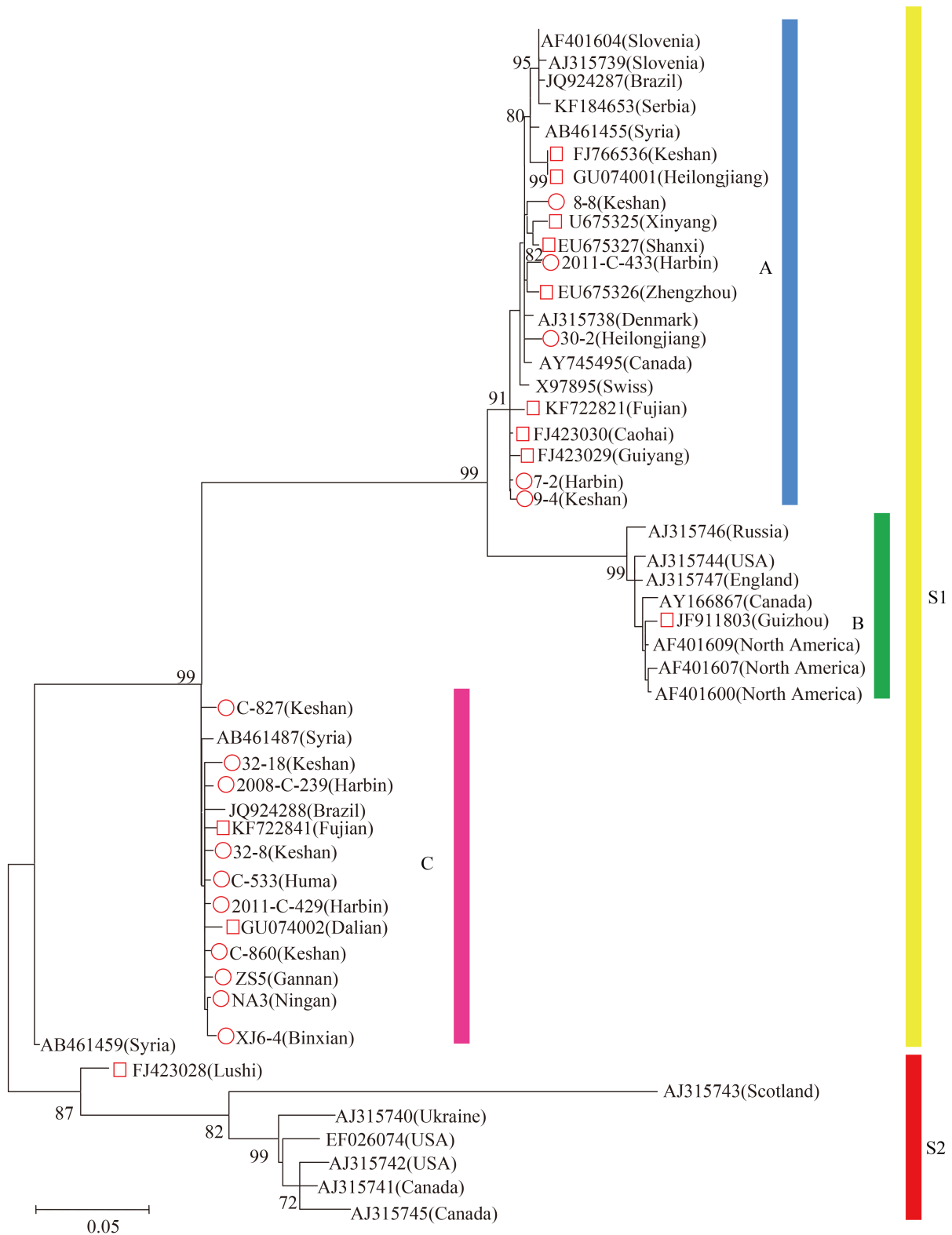


图 3. 不同地区PVY P1基因的进化树分析

Figure 3. Phylogenetic tree analysis of PVY P1 genes from different regions. ○: isolates from China; ◻: samples of this study; S1, S2, A, B, C: group number.

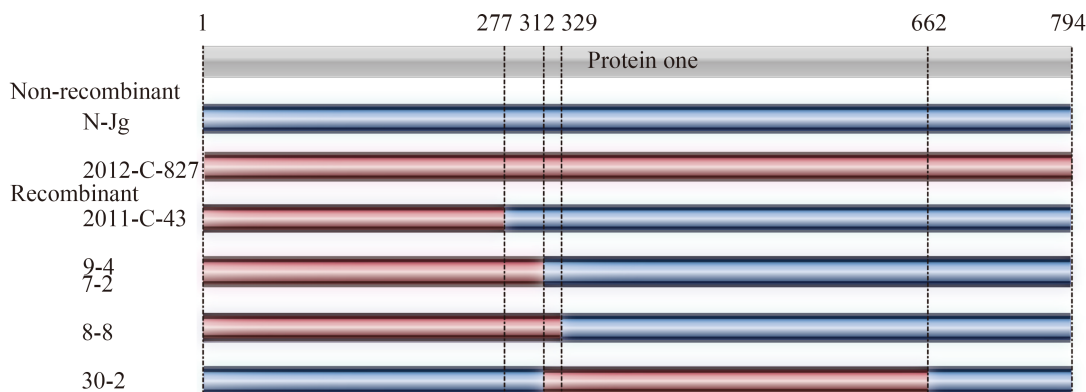


图 4. 15个分离物重组位点的检测

Figure 4. Detection of recombination events in 15 PVY isolates.

区域的差异。所以对P1基因区域的研究,对整个PVY株系的进化有很大的作用及意义。本研究通过对黑龙江省15个马铃薯Y病毒P1基因进行分析,并与国内样品和国外样品相比较,发现B亚组基因类型是本地区的优势群组,无论是与国内其他地区样品比较还是与国外样品比较亲缘关系都有一定距离;而A亚组中的5个样品的P1基因与C亚组中样品有较大差异,且这5个样品间也有一定的差异,并与国内其他地区 and 国外一些样品的P1基因序列比较接近(图3)。

试验从GenBank中选择了国内其它地区样品和世界各地的PVY P1基因进行进化树分析,比较中国PVY与国外的亲缘关系。由图3可以看出,所有P1可分为S1、S2两大组,而本次试验所选取的黑龙地区的样品株系,均落在S1组,其中主要在A亚组(5个)和C亚组(10个)。从已报道的分离物P1来看,S1组的比例要大于S2组,说明含有这类P1基因的PVY株系所占比例也较大。另外,根据GenBank中已经上传的序列提供的PVY株系信息,AB461455和AB461487两个P1基因确定为属于PVY^{NTN-NW}株系^[16],而本次试验选用的来自于黑龙地区的样品,其中8-8、30-2、2011-C-433等5个样品与AB461455分为一组,其它样品则与

AB461487的亲缘关系较近,这就表明本次试验所选用的样品其P1基因与PVY^{NTN-NW}株系是相似的。而PVY^{NTN-NW}株系是由PVY^{NTN}和PVY^{NW}经重组而形成的新的株系,这说明了黑龙地区的PVY来源也以重组株系为主,而不是以过去常见的PVY^N、PVY^O等未经重组的纯株系。

黑龙地区以及国内外的PVY病毒P1基因比较分析说明,PVY受环境影响较大,黑龙地区10个分在C组中的PVY在长期的进化产生了具有地方特点的变化,而后来A组的5个样品可以说明,中国大部分PVY有可能是跟随国外品种资源的引进进入,同时PVY也随国内不同区域间的资源交流和种薯调运而传播。同时,从P1基因的分析还发现,这15个样品与国内其他样品一样都是由PVY^N株系演变而来。迄今为止,由于PVY存在着复杂的株系分化现象,并不停地被研究者们发现和命名。目前已被报道的不同分子特征的PVY有十几种,几乎覆盖了所有马铃薯生产地,我国也已经报道了五种。由于P1基因与PVY病毒症状的表达有密切关系,P1基因的变化会对PVY的致病性有影响,PVY株系的多样性对于PVY的分子检测及防治均有重要意义,所以对PVY株系的研究还应该继续深入下去。

参考文献

- [1] Valkonen JPT. Viruses: economical losses and biotechnological potential. Oxford: Elsevier Scientific Publishing Company, 2007: 619–641.
- [2] Boukhris-Bouhachem S, Djilani-Khouadja F, Fakhfakh H, Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Incidence and characterization of potato virus Y in seed potatoes in Tunisia. *Potato Research*, 2010, 53(3): 151–166.
- [3] Nie BH, Singh M, Sullivan A, Singh RP, Xie CH, Nie XZ. Recognition and molecular discrimination of severe and mild PVY^O variants of potato virus Y in potato in New Brunswick, Canada. *Plant Disease*, 2011, 95(2): 113–119.
- [4] Nie BH, Sing M, Murphy A, Sullivan A, Xie CH, Nie XZ. Response of potato cultivars to five isolates belonging to four strains of potato virus Y. *Plant Disease*, 2012, 96(10): 1422–1429.
- [5] Singh RP, Valkonen JPT, Gray SM, Boonham N, Jones RAC, Kerlan C, Schubert J. The naming of potato virus Y strains infecting potato. *Archives of Virology*, 2008, 153(1): 1–13.
- [6] Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, Ohshima K. Genetic structure of a population of potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 2008, 131(2): 199–212.
- [7] Jones RAC. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology*, 1990, 117(1): 93–105.
- [8] Blanco-Urgoiti B, Tribodet M, Leclere S, Ponz F, de San Román CP, Legoburu FJ, Kerlan C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(8): 811–819.
- [9] Kerlan C, Tribodet M, Glais L, Guillet M. Variability of potato virus Y in potato crops in France. *Journal of Phytopathology*, 2011, 147(11/12): 643–651.
- [10] Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single or multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Archives of Virology*, 2002, 147(2): 363–378.
- [11] Ali MC, Maoka T, Natsuaki KT. The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN}. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155(7/8): 409–415.
- [12] Ali MC, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT. PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of potato virus Y predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathology*, 2010, 59(1): 31–41.
- [13] Chrzanowska M. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland. *Potato Research*, 1991, 34(2): 179–182.
- [14] Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Specific detection of the PVY^N-W variant of potato virus Y. *Journal of Virological Methods*, 2005, 125(2): 131–136.
- [15] van den Heuvel JFJM, van der Vlugt RAA, Verbeek M, de Haan PT, Huttinga H. Characteristics of a resistance-breaking isolate of potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. *European Journal of Plant Pathology*, 1994, 100(5): 347–356.
- [16] Ali MC, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT. The simultaneous differentiation of potato virus Y strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 2010, 165(1): 15–20.
- [17] Piche LM, Singh RP, Nie X, Gudmestad NC. Diversity among potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology*, 2005, 94(12): 1368–1375.
- [18] Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P. A multiplex PCR assay to characterize potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease*, 2006, 90(7): 935–940.
- [19] Crosslin JM, Hamm PB, Hane DC, Jaeger J, Brown CR, Shiel PJ, Berger PH, Thornton RE. The Occurrence of PVY^O, PVY^N, and PVY^{N^O} strains of potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. *Plant Disease*, 2006, 90(8): 1102–1105.
- [20] Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewski J. Differentiation of potato virus Y strains using improved sets of

- diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods*, 2007, 140(1/2): 66–74.
- [21] Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 2001, 74(1/2): 157–175.
- [22] Brantley JD, Hunt AG. The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *Journal of General Virology*, 1993, 74(Pt 6): 1157–1162.
- [23] Merits A, Guo DY, Järvekülg L, Saarma M. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, 1999, 263(1): 15–22.
- [24] Shi YH, Chen J, Hong XY, Chen JP, Adams MJ. A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(6): 785–790.
- [25] Hu XX, He CZ, Xiao Y, Xiong XY, Nie XZ. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China. *Archives of Virology*, 2009, 154(8): 1303–1312.
- [26] Nie XZ, Singh RP. Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. *Virus Genes*, 2003, 26(1): 39–47.
- [27] Kato S, Shimamoto Y, Mikami T. The apple mitochondrial *atp9* gene: RNA editing and co-transcription with exons a and b of the *nad5* gene. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93(3): 572–575.
- [28] Zhang S, Yang JG, Wang FL, Qian YM, Shen LL, Wang Y. Sequencing and analysis of PVY^N strain in tobacco from Guizhou province. *Chinese Tobacco Science*, 2011, 32(1): 47–51. (in Chinese)
张帅, 杨金广, 王凤龙, 钱玉梅, 申莉莉, 王永. 贵州烟草上一株PVY坏死株系全序列测定与分析. 中国烟草科学, 2011, 32(1): 47–51.
- [29] Guo XQ, Lv SE, Zhu CX, Song YJ, Meng XB, Zheng CC, Wen FJ. RNA-MEDIATED viral resistance against potato virus Y (PVY) in transgenic tobacco plants. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(4): 349–356. (in Chinese)
郭兴启, 吕士恩, 朱常香, 宋云枝, 孟祥兵, 郑成超, 温孚江. 利用RNA介导的抗病性获得高度抗马铃薯Y病毒的转基因烟草. 植物病理学报, 2001, 31(4): 349–356.
- [30] Li P, Song YZ, Liu XL, Zhu CX, Wen FJ. Study of virus resistance mediated by inverted repeats derived from 5' and 3' ends of coat protein gene of potato virus Y. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(1): 69–76. (in Chinese)
李鹏, 宋云枝, 刘晓玲, 朱常香, 温孚江. 马铃薯Y病毒CP基因5'端和3'端反向重复结构介导的抗病性研究. 植物病理学报, 2007, 37(1): 69–76.

Characteristics of P1 gene of potato virus Y in Heilongjiang

Shuxin Han¹, Yanju Bai^{2*}, Junhua Zhang^{1*}, Yanling Gao^{1,2}, Wei Zhang^{1,2}, Guoquan Fan², Shu Zhang², Cailing Qiu^{1,2}, Zhen He³

¹ College of Agricultural, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

² Virus-free Seeding Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

³ School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: **[Objective]** Based on different potato virus Y isolates gene sequencing, we studied the diversity of potato virus Y strains, to provide information for molecular detection, prevention and control of the virus. **[Methods]** P1 gene of 15 samples of potato virus Y of Heilongjiang Province was cloned and then the sequences of genes were analyzed by using phylogenetic tree. **[Results]** Samples were divided into two groups. According to a comparative analysis, 10 samples have highly conservative and homologous genes. They are the dominant population in the research area and have certain genetic distance to other domestic samples and foreign samples. In another group, 5 samples differ significantly with local dominant population in term of P1 gene. These 5 samples also have some differences and their P1 genes are close to those of other domestic samples and foreign samples. By comparing PVY strain data provided by uploaded sequences in GenBank, it found that P1 gene of test samples is similar with PVY^{NTN-NW} strains. These 15 samples as well as other domestic samples are evolved from PVY^N strains. **[Conclusions]** The P1 gene analysis demonstrated that PVY is influenced by environment significantly and PVY of 10 samples in Heilongjiang develops local characteristics in the long-term evolution. The later 5 samples reflect that most PVY in China may be introduced by foreign cultivars. At the same time, PVY spreads through regional resource exchange and tuber transportation in China.

Keywords: Heilongjiang, potato virus Y (PVY), P1 gene

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the China Agriculture Research System (CARS-10-P14) and by the Harbin Science and Technology Research Fund Innovative Talents Project (2015RQQYJ031)

*Corresponding author. E-mail: Yanju Bai, yanjubai@163.com; Junhua Zhang, Podozjh@163.com

Received: 31 August 2015; Revised: 3 February 2016; Published online: 2 March 2016