



福建甘薯病毒病原鉴定及主要病毒多样性

李华伟 刘中华 张鸿 李国良 林赵森 邱思鑫*

福建省农业科学院作物研究所 农业部南方薯类科学观测实验站/福建省特色旱作物品种选育工程技术研究中心 福建 福州 350013

摘要:【背景】病毒病是甘薯的一种重要病害,给甘薯生产带来了严重的经济损失,而生产中甘薯病毒病病原种类复杂多样。【目的】明确福建甘薯病毒病种类、分布及流行,对主要病毒进行多样性分析。【方法】从福建主要甘薯种植区采集病毒病样品,利用 PCR/RT-PCR 的方法对采集的样品进行病原检测,获得病毒序列,利用 MEGA 6.0 构建系统进化树进行遗传分析。【结果】从福建 7 个甘薯产区鉴定 12 种甘薯病毒,包括 9 种 RNA 病毒:甘薯羽状斑驳病毒(Sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)、甘薯褪绿矮化病毒(Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)、甘薯 G 病毒(Sweet potato virus G, SPVG)、甘薯 C 病毒(Sweet potato virus C, SPVC)、甘薯 2 号病毒(Sweet potato virus 2)、甘薯褪绿斑病毒(Sweet potato chlorotic fleck virus, SPCFV)、甘薯潜隐病毒(Sweet potato latent virus, SPLV)、甘薯轻型斑点病毒(Sweet potato mild speaking virus, SPMSV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV), 3 种 DNA 病毒:甘薯卷叶病毒(Sweet potato leaf curl virus, SPLCV),甘薯无症状 1 号病毒(Sweet potato symptomless virus 1, SPSMV-1),甘薯杆状 DNA 病毒 B (SPBV-B)。SPFMV、SPCSV、SPVG 和 SPLCV 检出率最高,分别为 50.28%、41.90%、35.75%和 24.58%,CMV 检出率最低,为 2.79%,未检测到甘薯 C-6 病毒(Sweet potato C-6)和甘薯轻型斑驳病毒(Sweet potato mild mottle virus, SPMMV)。福建甘薯主要以 2–6 种病毒复合侵染为主,单一侵染率占 14.39%,2 种以上复合侵染占 85.61%。福建 SPFMV 分离物存在 EA、O 和 RC 3 种株系,SPCSV 分离物存在 WA 1 种株系,未发现 EA 株系,甘薯卷叶病毒分属于 2 个不同的株系群。【结论】福建甘薯病毒种类多样,以复合侵染为主,且存在多种株系,遗传结构复杂。

关键词: 甘薯病毒病, 鉴定, 复合侵染, 遗传多样性

Foundation items: Special Fund for Scientific Research in the Public Interest of Fujian Province (2017R1026-4); Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-10-B14); Program of Seed Industry Innovation and Industrialization of Fujian Province (fjzycxny2017005); Program of Innovative Research Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (STIT2017-2-3)

*Corresponding author: E-mail: qiuqing886@139.com

Received: 20-06-2019; Accepted: 20-08-2019; Published online: 17-10-2019

基金项目: 福建省公益类科研专项(2017R1026-4); 现代农业产业技术体系(CARS-10-B14); 福建省种业创新与产业化工程项目(fjzycxny2017005); 福建省农业科学院创新团队项目(STIT2017-2-3)

*通信作者: E-mail: qiuqing886@139.com

收稿日期: 2019-06-20; 接受日期: 2019-08-20; 网络首发日期: 2019-10-17

Identification and genetic diversity analysis of sweet potato virus in Fujian province

LI Hua-Wei LIU Zhong-Hua ZHANG Hong LI Guo-Liang LIN Zhao-Miao QIU Si-Xin*

Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Scientific Observing and Experimental Station of Tuber and Root Crops in South China, Ministry of Agriculture, Fujian Engineering Research Center for Characteristic Dry Crop Varieties Breeding, Fuzhou, Fujian 350013, China

Abstract: [Background] Virus infects sweet potato plants, and causes serious economic losses frequently in Fujian province. There may exist more than one species of sweet potato virus. [Objective] To determine the sweet potato virus species and prevalence in Fujian, and analyze the genetic diversity of the main viruses. [Methods] Viruses were isolated from samples with viral diseases symptoms from different sweet potato production areas in Fujian province, 14 pair primers of viruses infecting sweet potato were used to detect by PCR or RT-PCR. The PCR amplicons of SPFMV (sweet potato feathery mottle virus), SPCSV (sweet potato chlorotic stunt virus) and SPLCV (sweet potato leaf curl virus) from selected samples were cloned and sequenced. The alignments and phylogenetic analyses were performed with the MEGA 6.0 software package. [Results] The results showed that 12 virus species were detected infecting sweet potato in Fujian, of which 9 were RNA viruses, including sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV), sweet potato virus G (SPVG), sweet potato virus C (SPVC), sweet potato virus 2 (SPV2), sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), sweet potato latent virus (SPLV), sweet potato mild speaking virus (SPMSV), cucumber mosaic virus (CMV); and three DNA viruses including sweet potato leaf curl virus (SPLCV), sweet potato symptomless virus 1 (SPSMV-1), sweet potato badnavirus B (SPBV-B). Among 179 sweet potato samples, SPFMV was detected in 90 samples (50.28%), SPCSV was detected in 75 samples (41.90%), SPVG in 64 samples (35.75%), SPVLCV in 44 samples (24.58%), and CMV just in five sample (2.79%), however, no samples infection was detected for SPV-2 and SPMMV. Mixed infections of 2–6 viruses were common (85.61%) in Fujian. The analysis of phylogenetic relationships showed that SPFMV isolates mainly belong to strains of EA, O and RC, SPCSV isolates mainly belong to strains of WA, and SPLCV isolates were divided into two groups. [Conclusion] There were many sweet potato viruses with complex infection models and genetic diversity were proved in Fujian province.

Keywords: Sweet potato virus diseases, Identification, Compound infection, Genetic diversity

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 是世界第七大粮食作物, 分布于世界 100 多个国家和地区。我国是世界上甘薯种植面积最大的国家, 年总产量已达 1 亿 t 左右, 占世界总产量的 80%^[1-2]。甘薯属无性繁殖作物, 生产过程中甘薯一旦感染病毒就会造成病毒的积累并继代传染, 造成严重的产量损失。据统计, 世界上每年甘薯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^[3-4]。

全世界已经鉴定出的能侵染甘薯的病毒有 32 种, 分属于 9 个科^[5]。最常见的 RNA 病毒主要有马铃薯 Y 病毒属的甘薯病毒有甘薯羽状斑驳病毒 (Sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)、甘

薯轻型斑点病毒 (Sweet potato mild speckling virus, SPMSV)、甘薯潜隐病毒 (Sweet potato latent virus, SPLV)、甘薯 G 病毒 (Sweet potato virus G, SPVG)、甘薯 C 病毒 (Sweet potato virus C, SPVC) 5 种^[5]。毛形病毒属有甘薯褪绿矮化病毒 (Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) 1 种。黄瓜花叶病毒属的黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)^[6-7]。DNA 病毒主要有菜豆金色黄花叶病毒属的甘薯卷叶病毒 (Sweet potato leaf curl virus, SPLCV)、甘薯中国曲叶病毒 (Sweet potato leaf curl China virus, SPLCCNV) 和甘薯乔治亚曲叶病毒 (Sweet potato leaf curl Georgia virus, SPLCGoV) 3 种^[8-11]。据报道, 我国甘薯至少存在 15 种甘薯病

毒^[12-14], 在全国甘薯产区普遍存在, 近几年报道最多的是 SPFMV 和 SPCSV 复合侵染引起的甘薯病毒病(SPVD)^[15-16], 当 SPCSV 和 SPFMV 复合侵染时, SPFMV 的含量比 SPFMV 单独侵染时增加 600 倍^[17], 该病毒在我国被首次报道后在全国甘薯种植区开始蔓延, 并和其他属的病毒以复合侵染的方式侵染甘薯, 降低甘薯的品质和产量, 同时甘薯双生病毒的频繁发生, 严重影响甘薯产业的发展。

甘薯是福建省第二大粮食作物, 常年种植面积在 17 万 hm^2 , 近几年调查发现, 甘薯病毒病随着全国及全省甘薯产区的种苗及种质交换而频繁发生, 导致了甘薯病毒病逐年加重并呈现蔓延式的发展, 尤其是 SPVD 在福建甘薯产区的频发, 已经严重威胁到福建省甘薯产业健康发展^[18-19]。而近年来, 有关福建甘薯病毒病鉴定、分布和流行报道较少, 因此, 为了明确福建甘薯病毒病的种类、分布及流行情况, 本研究调查福建 7 个甘薯产区病毒病, 采集病毒病样品, 利用 PCR/RT-PCR 鉴定方法, 对福建甘薯病毒病的病原物种类进行检测和鉴定, 以期为今后甘薯病毒病的防控工作提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料、主要试剂和仪器

调查福建省甘薯种植区福州、莆田、泉州、龙岩、三明、宁德、漳州 7 个地区的大田和甘薯苗地甘薯病毒病发生情况。同时采集甘薯病毒病以及无症状(健康)的甘薯叶片样品, 放入自封袋带回实验室液氮冷冻处理后进行病毒检测。

RNA 提取试剂盒(EasyPure Plant RNA Kit)、DNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒(EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix)、PCR SuperMix、DNA 产物纯化试剂盒、质粒纯化试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。ABI 梯度 PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 凝胶成像系统, VILBER LOURMAT 公司; 水平电泳仪, 北京六一生物技术有限公司。

1.2 甘薯病毒的检测

1.2.1 植物总 RNA 与总 DNA 的提取

样品 RNA 提取采用北京全式金生物技术有限

公司的植物总 RNA 提取试剂盒, 按照其操作步骤提取甘薯样品叶片的总 RNA。样品 DNA 提取采用植物总 DNA 提取试剂盒(EasyPure Plant Genomic DNA Kit), 按照其操作步骤提取甘薯叶的总 DNA。获得的总 RNA 和总 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 cDNA 合成

cDNA 合成参照北京全式金生物技术有限公司反转录试剂盒合成第一链 cDNA 合成, cDNA 模板用于后续的试验。

1.2.3 引物的设计

根据已报道的侵染甘薯的不同病毒的检测引物序列合成部分引物, 在 NCBI 上下载已登录的甘薯病毒基因组序列, 根据其保守序列信息使用 Primer Premier 5 软件设计引物。引物由福州尚亚生物技术有限公司合成, 引物序见表 1。

1.2.4 PCR 和 RT-PCR 扩增

以甘薯总 DNA 为模板进行 DNA 病毒的 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): $2\times\text{EasyTaq}$ PCR SuperMix 12 μL , 总 DNA 模板(50–100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2 μL , 正、反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , 灭菌水补足至 25 μL 。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 5 次循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 25 次循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

以反转录 cDNA 为模板进行 RNA 病毒的 RT-PCR 扩增。单一反应体系(25 μL): $2\times\text{EasyTaq}$ PCR SuperMix 12 μL , DNA 或 cDNA 模板(50–100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , 水补足至 25 μL 。三重反应体系(25 μL): $2\times\text{EasyTaq}$ PCR SuperMix 12 μL , DNA 或 cDNA 模板(50–100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2 μL , SPFMV 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.3 μL , SPCSV 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.8 μL , SPVG 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , 水补足至 25 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $52\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(根据引物的退火温度决定 $52\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 RT-PCR 和 PCR 检测几种病毒的引物

Table 1 Primers for RT-PCR and PCR detection of sweet potato virus

病毒 Virus	引物序列 Forward reverse primer (5'→3')	基因 Gene	片段 Fragment (bp)	来源 Sources
甘薯退绿矮化病毒 SPCSV	CGGTCARATTGGAAGGTA TTCGCTATCAAAGAAGTRTC	<i>hsp70</i>	304	[19]
甘薯羽状斑驳病毒 SPFMV	TCCACCACCCACAATAAC ACGGTTTCGCATCTCTAT	<i>cp</i>	601	[19]
甘薯 G 病毒 SPVG	ACAGGACCATTACCACCA AATCTTCCCTGACACCCTC	<i>cp</i>	433	[19]
甘薯 2 号病毒 SPV2	ACGTAGCCCAAGGCAAGTTA CCATTTCCAGCATCAGACACCC	<i>cp</i>	275	This study
甘薯 C 病毒 SPVC	AGGGCCGTATACAGCACCAGA CAGTWTGARGTTGCRAACACCCG	<i>cp</i>	526	This study
甘薯 C-6 病毒 SPV6	AAAAGCTTGTTGGCAATTTGTG TTGGCATTTCGATTGTCCC	<i>TGBp2</i>	591	This study
甘薯潜隐病毒 SPLV	CCAAATATCAATGGTGATTGGGT CCACGCATTCCAAGTAGTGTGTGT	<i>cp</i>	420	[12]
甘薯轻型斑点病毒 SPCFV	CTATGCTGCTCACTCAAGC TTGATTGGCCACAAGCGAAG	<i>cp</i>	600	[20]
甘薯褪绿斑病毒 SPMMV	ACAGAAGGCAAGGATAAGGG ACATTGGCATAACCAGCAGT	<i>cp</i>	954	This study
甘薯轻型斑驳病毒 SPMSV	GCTAGTACTGGGGTAAATCAA GTTTTCCAGTCACGAC	<i>cp</i>	1 100	[12]
黄瓜花叶病毒 CMV	ATGGACAAATCTRAATCAACCAG TCARACTGGGAGCACYCCWGAYGT	<i>cp</i>	657	[12]
甘薯卷叶病毒 SPLCV	GGAACAGGCATTAGTTAGGA TGCAACGCAGAGTCTGATAT	<i>cp</i>	161	[21]
甘薯无症状 1 号病毒 SPSMV-1	TTCTACCTGGGATGATGT GTATTTGGGAAGTTCTGG	<i>cp</i>	366	This study
甘薯杆状 DNA 病毒 B SPBV-B	CAACATCTCGGCAGTAAC TAGACCATCCCAGTCCAA	<i>cp</i>	307	This study

取 5 μ L 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳 (GenGreen 染色), 电泳缓冲液为 0.5% TBE 缓冲液, 在 120 V 电压下电泳 35 min, 凝胶成像仪观察拍照。

1.2.5 PCR 产物的克隆及序列分析

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切下特异性片段, 利用北京全式金生物技术公司的通用型 DNA 纯化回收试剂盒进行纯化, 纯化后连接到 T 载体上, 转化大肠杆菌, 经 PCR 验证后送福州尚亚生物技术有限公司测序。测序完成后将序列在 NCBI 库中进行 BLAST 比对, 利用 DNAMAN 软件拼接后再利用 MEGA 6.0 软件进行同源性分析^[22], 采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 自举值 (Bootstrap) 1 000 次构建系统进化图谱。

2 结果与分析

2.1 甘薯病毒病的田间症状及发生趋势

对福建省 7 个甘薯产区的甘薯病毒病进行了调查, 调查结果表明, 甘薯感染病毒后植株的症状类型主要表现为植株矮化、成簇生长, 严重影响甘薯地上部生长。叶片上的症状主要表现为花叶、皱缩、明脉、黄脉、叶脉突起、卷曲、疱疹畸形等症状 (图 1A-I), 严重影响叶片的光合作用, 导致产量严重损失。

综合调查结果表明, 7 个甘薯产区的甘薯病毒病发病率 5%–95%, 其中以泉州地区发病率最高, 发病率最高的地块达 95%。莆田、龙岩、福州发病率次之, 三明、宁德地区的发病率最低, 发病率较高的地块达 5%。



图 1 甘薯病毒病症状

Figure 1 Symptoms of sweet potato virus diseases

2.2 甘薯的病毒种类检测

用 SPCSV、SPFMV、SPVG、SPV2、SPVC、SPC-6、SPLV、SPCFV、SPMMV、SPMSV、CMV、SPLCV、SPSMV-1、SPBV-B 14 种甘薯病毒的特异引物对采集的甘薯疑似染病的样品进行 RT-PCR 和 PCR 检测, 共检测到 12 种甘薯病毒, 包括 9 种 RNA 病毒(SPCSV、SPFMV、SPVG、SPV2、SPVC、SPLV、SPCFV、SPMSV、CMV) 和 3 种 DNA 病毒(SPLCV、SPSMV-1、SPBV-B)。12 种病毒的 PCR 扩增各获得了一条特异性目的条带, 各条带大小符合目的片段大小, 部分病毒的 PCR 扩增电泳图见图 2A-C。对获得的 PCR 片段

进行回收、克隆、序列测定及 BLAST 分析, 结果表明, PCR 产物与相应病毒的核苷酸序列一致性均达 97% 以上, 表明 PCR 可靠性。

2.3 福建省甘薯病毒检出率及分布

对采集 7 个地区的甘薯样品 179 份进行 RT-PCR 和 PCR 检测, 结果表明: 179 份甘薯样品中共有 139 份感染甘薯病毒病, 阳性率为 77.65%。其中 SPFMV、SPCSV 和 SPVG 检出率最高, 分别为 50.28%、41.90%、35.75%, 检出率次之的依次是 SPLCV、SPVC、SPLV、SPBV-B、SPV2、SPCFV、SPMSV、SPSMV-1, 检出率分别为 24.58%、24.58%、23.46%、21.23%、17.88%、16.20%、14.53%、

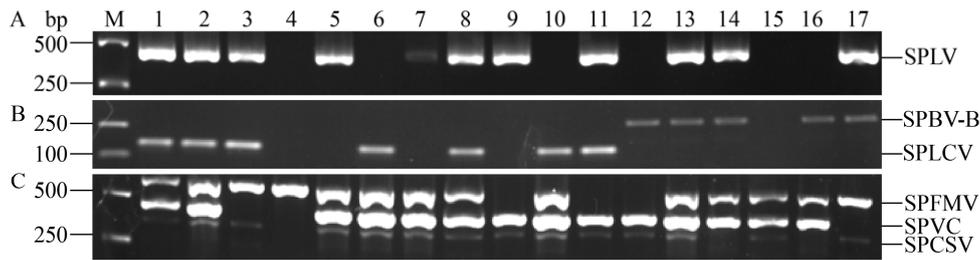


图2 单重 PCR 和三重 PCR 检测甘薯病毒病

Figure 2 Single and triple PCR detection of sweet potato virus diseases

注: A 和 B: 单一 PCR; C: 多重 PCR.

Note: A and B: Single PCR; C: Triple PCR.

10.61% (图3)。CMV 的检出率在所有检测病毒病的最低,只有 5 份样品检测为阳性,占 2.79%,CMV 主要检出区域为泉州、莆田和福州 3 个地区,在其他地区未检测到 CMV。SPC-6 和 SPMMV 在 7 个地区的检出率为 0%。

根据各个地区的病毒检测结果分析,福建省甘薯病毒病主要分布于泉州、莆田、龙岩和福州等地区(图4),且这 4 个地区的病毒类型多样,而三明、宁德、漳州的甘薯病毒病较为单一,以 SPVD 侵染为主。连续几年的甘薯病毒病调查结果表明,福建省甘薯病毒病的发生呈现以泉州为中心,向其他甘薯产区逐步扩散,呈现从南到北的侵染过程。由于全国(省)甘薯种苗交换的频繁发生,导致了福建省甘薯病毒病蔓延并呈逐年加重的趋势。

2.4 甘薯病毒病的复合侵染

在 139 份检测出侵染甘薯病毒病样品中,1 种病毒单独侵染的有 20 份,占 14.39%,2 种及以上病毒侵染的样品有 119 份,占 85.61%,2 种病毒侵染中 RNA 病毒多以 SPFMV、SPCSV、SPVG、SPLV、SPVC、SPV2 中的其中 2 种病毒复合侵染为主,其中以 SPFMV 和 SPCSV 复合侵染最为常见,占 2 种病毒复合侵染的 68.75%。DNA 病毒以 SPLCV、SPBV-B 复合侵染为主。3 种病毒复合侵染的有 51 份,占 36.69%,3 种病毒主要以 SPFMV、SPCSV、SPVG、SPVC、SPV2、SPCFV 其中的 3 种侵染为主。4 种病毒复合侵染的有 26 份,占

18.71%,4 种病毒主要以 SPFMV、SPVG、SPVC、SPV2 和 SPFMV、SPV2、SPLV、SPVG 侵染为主,其次是 SPFMV、SPCSV、SPVG、SPVC。5 种、6 种病毒复合侵染的比例分别占 5.76%、2.88%,没有检测到 7 种以上病毒复合侵染方式。

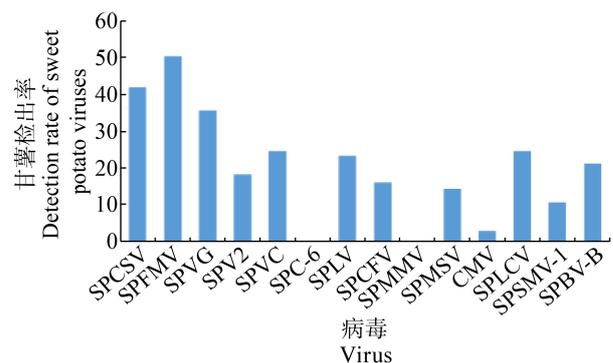


图3 不同甘薯病毒检出率

Figure 3 Detection rate of different sweet potato viruses

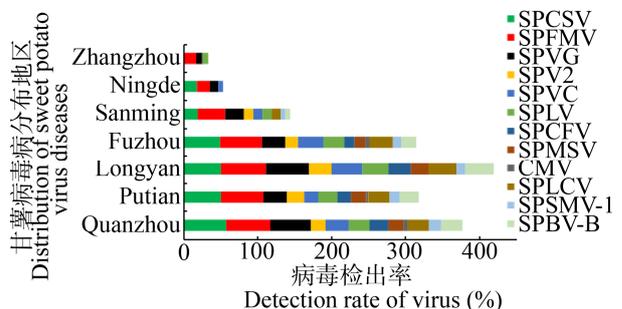


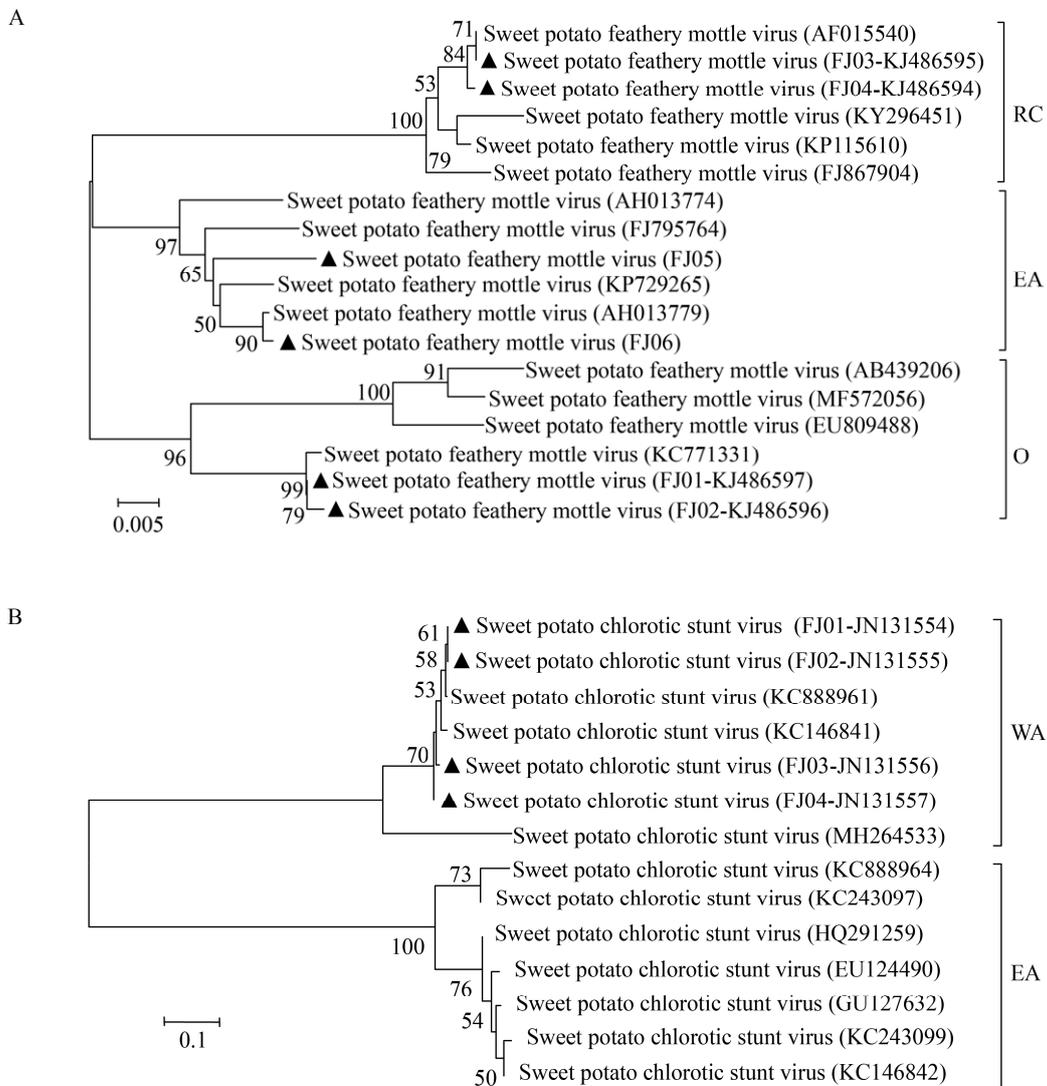
图4 不同地区甘薯病毒病种类分布

Figure 4 Distribution of sweet potato virus diseases in different areas

2.5 主要病毒遗传多样性分析

根据 SPFMV、SPLCV 的 *cp* 基因和 SPCSV 的 *hsp70* 基因核苷酸的分子变异情况可划分为不同的株系类别, 从 NCBI 中下载已报道的 SPFMV、SPLCV 的典型株系的 *cp* 和 SPCSV 的 *hsp70* 基因的保守核苷酸序列, 比对下载的核苷酸序列和本研究分离的部分分离物核苷酸序列, 用生物学软件 MEGA 6.0 构建不同分离物的系统发育树(图 5)。从聚类图可以看出, 福建省 6 个 SPFMV 分离物分别聚类到 RC 株系(褐裂株系)、EA 株系(东非株系)

和 O 株系(普通株系)(图 5A), 说明福建省存在 SPFMV 3 种株系类型, 从分离物的比对结果分析, SPFMV 以 RC 和 O 株系为主, 分别占 60% 和 35%, EA 株系占 15%。SPCSV 分离物均聚类到 WA 株系(西非株系)(图 5B), 表明福建省 SPCSV 仅存在 WA 株系, 还未发现 EA 株系(东非株系)。系统发育树显示 SPLCV 福建分离物分属 2 个株系(图 5C), 与已报道的山东省及河南省的 SPLCV 分离物之间亲缘关系较近, 说明福建省 SPLCV 存在遗传多样性。



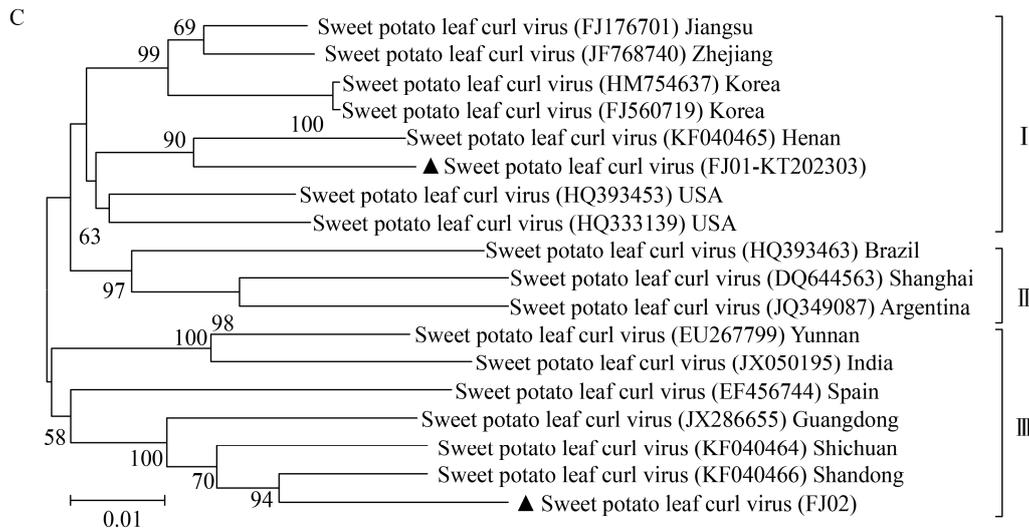


图 5 Neighbor-Joining 法构建的 SPFMV、SPCSV、SPLCV 不同分离物部分核苷酸序列的系统发育树

Figure 5 Neighbor-Joining phylogenetic dendrograms based on the partial nucleotide sequences of different SPFMV and SPCSV and SPLCV isolates

注: ▲: 本研究获得的分离物. A: SPFMV; B: SPCSV; C: SPLCV. 括号内序号为序列的 GenBank 登录号. 分支点上的数字表示 1 000 次重复后得到的置信值; 标尺表示 100 个核苷酸中有 1 个被替换.

Note: ▲: The isolates described in this study. A: SPFMV; B: SPCSV; C: SPLCV. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Numbers at the branch points indicates bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

3 讨论与结论

本研究系统对福建 7 个甘薯产区的甘薯病毒病进行了调查及鉴定, 调查结果表明, 7 个甘薯产区的甘薯病毒病危害程度不同, 发病率在 5%–95%, 主要以泉州、莆田、龙岩、福州发生最严重, 检出率最高, 病毒种类最多, 包含了检测出的 12 种病毒, 这 4 个甘薯产区列为重点检疫地区, 防止带病种苗向其他地区传播扩散。宁德、三明、漳州发病较轻, 其中三明地区检测到 7 种病毒, 宁德地区检测到 4 种病毒, 而漳州地区的病毒种类较为单一, 只检测到马铃薯 Y 病毒属的 SPFMV、SPVG 和 SPLV 3 种病毒, 这 3 个甘薯产区应重点防控 SPFMV 和 SPVG, 同时防止其他病毒的传入。在采集的 179 个样品中, 139 个样品检测到 12 种甘薯病毒, RNA 病毒 9 种, DNA 病毒 3 种, 病毒检出率为 77.65%。本研究检出的病毒种类均多于乔奇等^[12] (2012) 报道福建检出甘薯病毒 6 种, Xie

等^[14] (2013) 报道福建检出甘薯病毒有 7 种, 邹为坤^[18] (2016) 报道福建检出甘薯病毒有 11 种, 说明随着甘薯交换苗的频发, 导致了福建甘薯病毒种类在逐年增加、流行加速、传播更快、危害更加严重。因此各地区在引种及种苗调运过程中要加强病毒的检测, 防止带病种苗的传播。

由于甘薯为无性繁殖作物, 容易感染病毒并造成病毒的积累, 病毒传播方式主要有种子和薯块带毒、蚜虫持久性和非持久性、粉虱非持久性及机械摩擦传播, 多种传播方式导致甘薯可以被多种病毒复合侵染^[23]。本研究检出的 12 种病毒中 SPFMV、SPCSV、SPVG、SPLCV、SPVC、SPLV 的检出最高, 这些病毒大部分属于马铃薯 Y 病毒属 (SPFMV、SPVG、SPVC、SPV2、SPLV), 而马铃薯 Y 病毒属能够依靠机械、蚜虫和粉虱传播^[24], 因此本研究检出的病样中主要有 2 种及 2 种以上病毒复合侵染, 复合侵染率占 85.61%, 单独侵染的

病样仅占 14.39%。同时本研究通过对 7 个地区的甘薯病毒病进行了系统的鉴定,发现不同病毒流行和分布存在一定的差异,SPFMV 和 SPVG 分布最广,在 7 个甘薯产区均能检测到 SPFMV 和 SPVG 存在,其次是 SPCSV 和 SPLV,只有在漳州和宁德未检测到这 2 种病毒,其他地区均有检出,说明这 4 种病毒为福建省的流行病毒。而 CMV 只在泉州、莆田和福州有检出,其他地区未检出,说明不同地区的病毒存在局部侵染的情况,应加强流行病毒检疫,防止病毒的流出和流入,SPV-6 和 SPMMV 在所有产区未检出,这和以往报道中福建样品中未检测出 SPV-6 和 SPMMV 结果一致,而近几年 SPV-6 和 SPMMV 在我国的河北、四川、山东、河南均有报道^[12,14],因此福建省甘薯是否存在 SPV-6 和 SPMMV 及其他病毒还用待进一步研究。

甘薯病毒病(SPVD)是 SPFMV 和 SPCSV 协同侵染引起的,甘薯一旦感染 SPVD 会造成极大的影响,严重时可能造成甘薯绝产,SPVD 在世界甘薯产区均有发生,已成为甘薯生产最重要的病害之一^[25-27]。我国自报道发生 SPVD 以后,SPVD 在我国甘薯产区均有发生并逐年加重^[28-32],福建省是我国最早发现 SPVD 侵染的甘薯产区之一,而本研究中 SPVD 在福建省甘薯产区中检出率最高,除漳州没有检测到 SPVD 的发生外,其他 6 个地区均检出 SPVD,说明 SPVD 已经成为福建省最主要的流行病毒。因此今后要加大对 SPVD 特别是漳州产区的监测,防止 SPVD 流入和传播。

病毒的遗传变异主要通过基因突变、重组,基因突变和重组会导致病毒株系流行的改变,而病毒的复合侵染有利于其在寄主体内发生基因组重组而引起病毒变异,因此弄清病毒变异及流行株系有利于培育抗病品种。根据病毒株系的划分标准,SPFMV 划分 RC、EA 和 O 3 个株系,SPCSV 划分 EA 和 WA 2 个株系^[33-36]。近年的报道表明,我国甘薯上 SPFMV 存在上述 3 种株系,SPCSV 流行株系为 WA。本研究鉴定的 SPFMV 分离物进化分

析聚类到上述的 3 个株系,与邹为坤^[18] (2016)报道福建分离物属 EA 株系更为复杂,说明福建省 SPFMV 遗传结构较为复杂。鉴定的 SPCSV 的分离物进化分析聚类到上述 WA 株系,未检测到 EA 株系。SPLCV 分离物进化分析聚类到 2 个株系群,其中一类和广东、四川分离物的亲缘关系较近,另一类和河南、美国的分离物亲缘关系较近,说明福建省流行病毒的遗传结构复杂,病毒变异速率正在增加。因此有必要对福建省甘薯病毒进行实时监测、鉴定并研究其变异机制,制定科学的防治技术措施。

综上所述,由于福建省甘薯病毒病类型多样,多为复合侵染,病毒种类及流行株系已发生新的变化,遗传结构呈现多样,而病毒变异速率加快,增大甘薯病毒病防控难度。因此生产中应加强种苗质量监控,培育健康脱毒种苗,防止在种苗交换过程中病毒的传播。

REFERENCES

- [1] Ma JF, Cheng JH, Wang J, et al. Development of sweet potato industry at home and abroad[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(12): 1-5 (in Chinese)
马剑凤, 程金花, 汪洁, 等. 国内外甘薯产业发展概况[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(12): 1-5
- [2] Ma DF, Li Q, Cao QH, et al. Development and prospect of sweet potato industry and its technologies in China[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 28(5): 969-973 (in Chinese)
马代夫, 李强, 曹清河, 等. 中国甘薯产业及产业技术的发展与展望[J]. *江苏农业科学*, 2012, 28(5): 969-973
- [3] Zhang YQ, Guo HC. Research progress on the tip meristem culture of sweet potato[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(3): 74-76,106 (in Chinese)
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): 74-76,106
- [4] Zhang ZC, Ma HQ, Zhang GL. Advances in virus diseases of sweet potato[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2000(9): 19-22 (in Chinese)
张振臣, 马淮琴, 张桂兰. 甘薯病毒病研究进展[J]. *河南农业科学*, 2000(9): 19-22
- [5] Clark CA, Davis JA, Abad JA, et al. Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(2): 168-185
- [6] 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
- [7] Untiveros M, Fuentes S, Salazar LF. Synergistic interaction of sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and potyvirus infecting sweet potato[J]. *Plant Disease*, 2007, 91(6): 669-676
- [8] Luan YS, Zhang J, An LJ. First report of sweet potato leaf curl virus in China[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(8): 1111
- [9] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2016)[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(10): 2921-2949
- [10] Luan YS, Zhang J, Liu DM, et al. Erratum to: 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(3): 879-880
- [11] Liu QL, Zhang JX, Li XC, et al. Advances in research of DNA virus infecting sweet potato[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(3): 36-42 (in Chinese)
刘起丽, 张建新, 李学成, 等. 侵染甘薯的 DNA 病毒研究进展[J]. *植物保护*, 2017, 43(3): 36-42
- [12] Qiao Q, Zhang ZC, Zhang DS, et al. Serological and molecular detection of viruses infecting sweet potato in China[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(1): 10-16 (in Chinese)
乔奇, 张振臣, 张德胜, 等. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(1): 10-16
- [13] Wang QM, Zhang LM, Wang B, et al. Sweet potato viruses in China[J]. *Crop Protection*, 2010, 29(2): 110-114
- [14] Xie YP, Xing JY, Li XY, et al. Survey of sweet potato viruses in China[J]. *Acta Virologica*, 2013, 57(1): 81-84
- [15] Qin Y, Zhang Z, Qiao Z, et al. First report of sweet potato leaf curl Georgia virus on sweet potato in China[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(10): 1388
- [16] Gutiérrez DL, Fuentes S, Salazar LF. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru[J]. *Plant Disease*, 2003, 87(3): 297-302
- [17] Zhang ZC, Qiao Q, Qin YH, et al. First evidence for occurrence of sweet potato virus disease (SPVD) caused by dual infection of sweet potato feathery mottle virus and sweet potato chlorotic stunt virus in China[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(3): 328-333 (in Chinese)
张振臣, 乔奇, 秦艳红, 等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒共生共侵染引起的甘薯病毒病害[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(3): 328-333
- [18] Zou WK. Occurrence and control strategies of sweet potato virus disease in Fujian province[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agricultural and Forestry University, 2016 (in Chinese)
邹为坤. 福建省甘薯病毒病发生与防治策略[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2016
- [19] Li HW, Xu YQ, Qiu SX, et al. Establishment and application of a multiplex RT-PCR detection method for SPCSV, SPVG and SPFMV infecting sweetpotato[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(8): 1464-1470 (in Chinese)
李华伟, 许泳清, 邱思鑫, 等. 侵染甘薯的 SPCSV、SPVG、SPFMV 多重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *核农学报*, 2015, 29(8): 1464-1470
- [20] Bao GL, Zuo RJ, Rao WL, et al. Detection of sweet potato viruses in Yunnan and genetic diversity analysis of the common viruses[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(2): 236-248 (in Chinese)
包改丽, 左瑞娟, 饶维力, 等. 云南甘薯病毒的检测及主要病毒的多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(2): 236-248
- [21] Li HW, Liu ZH, Zhang H, et al. Establishment and application of a LAMP method for the rapid detection of sweet potato leaf curl virus[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(6): 1133-1140 (in Chinese)
李华伟, 刘中华, 张鸿, 等. 甘薯卷叶病毒 LAMP 快速检测技术的建立及应用[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(6): 1133-1140
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [23] Wang QM, Wang YC, Wang JJ, et al. Advances in virus diseases of sweet potato[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 1994(4): 36-39 (in Chinese)
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
- [24] Karyeija RF, Kreuze JF, Gibson RW, et al. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants[J]. *Virology*, 2000, 269(1): 26-36
- [25] Xie H, Su ZX, Yan H, et al. Pesticides could alleviate the symptoms of sweet potato virus disease (SPVD)[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2018, 7(5): 268-273
- [26] Qiao Q, Zhang ZC, Qin YH, et al. First report of sweet potato chlorotic stunt virus infecting sweet potato in China[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(3): 356
- [27] 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
- [28] Pu ZG, Qu JP, Wang DY, et al. Investigation and serological detection of sweet potato viruses in Sichuan province[J]. *Journal of China West Normal University (Natural Sciences)*, 2007, 28(4): 270-273 (in Chinese)

- 蒲志刚, 曲继鹏, 王大一, 等. 四川省甘薯病毒病调查及病原血清学鉴定[J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2007, 28(4): 270-273
- [29] Jiang SS, Zhang M, Wu B, et al. Molecular identification on mixed infection of sweet potato viruses in Shandong province[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(9): 97-101 (in Chinese)
姜珊珊, 张眉, 吴斌, 等. 山东省甘薯病毒复合侵染的分子鉴定[J]. 山东农业科学, 2018, 50(9): 97-101
- [30] Huang LL, Binhdan P, He FL, et al. The pathogenic virus species detection of sweet potato viral diseases in Guangxi[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(5): 1213-1218 (in Chinese)
黄利利, Binhdan P, 何芳练, 等. 广西甘薯病毒病的病原病毒种类检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(5): 1213-1218
- [31] Zhang XX, Wang XF, Lin JC, et al. Sweet potato virus diseases (SPVD): research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(1): 118-126 (in Chinese)
张新新, 王旭芳, 林坚淳, 等. 甘薯毁灭性病毒病害(SPVD)的研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(1): 118-126
- [32] Peng XQ, Wang HR, Zhang J, et al. Detection and identification of sweet potato virus diseases in Hubei[J]. China Plant Protection, 2017, 37(8): 20-23 (in Chinese)
彭小琴, 王浩然, 张俊, 等. 湖北甘薯病毒病的检测与鉴定[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(8): 20-23
- [33] Huang GX, Meng LQ, Zhu JC, et al. Establishment of duplex RT-PCR detection method for SPFMV and SPCSV infecting sweet potato[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2018, 49(6): 724-729 (in Chinese)
黄广学, 孟利前, 朱建晨, 等. 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和矮化退绿病毒(SPCSV)的双重 RT-PCR 检测技术体系构建[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(6): 724-729
- [34] Abad JA, Conkling MA, Moyer JW. Comparison of the capsid protein cistron from serologically distinct strains of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)[J]. Archives of Virology, 1992, 126(1/4): 147-157
- [35] Aritua V, Barg E, Adipala E, et al. Further evidence for limited genetic diversity among East African Isolates of sweet potato chlorotic stunt virus[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(3): 181-189
- [36] 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