

菊花上2种病毒的检测 及其部分外壳蛋白基因序列分析

雷 强^{1,2} 李 昊¹ 丁元明¹ 王云月²

1. 云南出入境检验检疫局技术中心,昆明 650228; 2. 云南农业大学植物保护学院,昆明 650201

摘要 采集昆明地区花卉基地和公园的269份菊花样品,调查并分析侵染菊花的番茄不孕病毒(*Tomato aspermy virus*, TAV)和菊花B病毒(*Chrysanthemum virus B*, CVB)的发病状况。ELISA和RT-PCR检测结果表明,TAV和CVB在菊花植株上的发病率分别为4.62%和16.70%。对3个TAV分离物和8个CVB分离物的外壳蛋白(coat protein, CP)基因的部分序列进行测定,并分别与GenBank登录的TAV和CVB序列进行比对和系统进化分析,结果显示各TAV分离物的CP基因核苷酸序列同源性为85.04%~98.02%。在系统进化树中聚集的2个簇中,昆明分离物都在同一簇。CVB的CP基因存在较明显的序列变异,核苷酸序列同源性为75.09%~84.99%,在系统进化树中聚为3个簇,昆明分离物均集中在同一簇。

关键词 菊花; 番茄不孕病毒; 菊花B病毒; 外壳蛋白基因; 系统进化分析

中图分类号 S 432.4⁺¹; S 682.1⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0704-06

菊花是中国的传统名花,在全世界都广泛栽培,具有很高的经济价值。侵染菊花的病毒有20多种,在中国已报道的有8种,其中番茄不孕病毒(*Tomato aspermy virus*, TAV)和菊花B病毒(*Chrysanthemum virus B*, CVB)发病最普遍^[1-4]。这2种病毒都可以通过蚜虫传播,在菊花上能引起黄色花叶、沿脉变色、花朵变形等症状,导致菊花品质下降和品种退化,对菊花的生产和贸易造成严重威胁。

TAV属黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*),病毒粒子为球形,直径约30 nm。其基因组由3条正单链RNA组成,可表达产生5个蛋白产物^[5]。TAV的寄主范围广,人工接种可侵染24科100多种植物,在世界种植菊花的国家均有分布。TAV侵染菊花后呈现系统花叶、病叶扭曲、花色不正常等症状^[6]。1986年舒秀珍等^[7]首次在中国的菊花上分离到TAV。

CVB属香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*),病毒粒子为曲折的杆状,大小为680 nm×12 nm,其基因组为1条8.0~8.5 kb的正单链RNA,具有6个开放阅读框^[8]。CVB可侵染多种菊科植物,染病后表现隐症、花叶或坏死斑等多种症状,人工接种能够侵染克利夫兰烟、心叶烟、黄花烟、碧冬茄和蚕豆

等^[9]。1950年在美国首先发现和报道了CVB,但实际上该病的发生和传播却早得多^[10]。此病在国内外的分布都很普遍,中国的北京、内蒙古、上海、福建、云南和台湾等地都有发生。

目前,TAV和CVB在中国的云南、福建、北京和台湾等地都有分布。笔者对昆明地区菊花植株上这2种病毒病的发生情况进行了调查,并首次对其分离物的分子变异进行了分析,旨在为研究2种病毒的侵染规律和系统发育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

2010—2011年间在位于云南省昆明市的嵩明虹华花卉公司、昆明大观公园、黑龙潭公园和昆明植物园采集类似病毒症状的菊花病样269份。一部分于4℃冰箱短期保存,另一部分于-80℃超低温冰箱长期保存,剩余部分用于培养观察症状变化。

1.2 引物设计

用DNAMAN软件比对GenBank已发布的TAV和CVB外壳蛋白(CP)的编码序列,选择保守区域设计引物。TAV的上游引物TAV1F为5'-TCGACCGACTAGAACTGAGA AG-3',下游引物

TAV2R 为 5'-CAGCACCGACATTAGACATGT-3', 扩增产物大小为 301 bp。CVB 的上游引物 CVB12F 为 5'-AGTGCAGCCTGGTCCCTTGT-3', 下游引物 CVB13R 为 5'-GTGCCGGTTGG-GAGGCAT-3', 扩增产物大小为 345 bp。

1.3 DAS-ELISA 检测

采用 TAV 和 CVB 的 DAS-ELISA 试剂盒(美国 Agdia 公司), 参照试剂盒使用说明书进行检测。

1.4 RNA 提取

取 0.1 g 待检样品用液氮研磨成粉末状, 移入灭菌的 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 的 Trizol 试剂, 震荡摇匀, 室温静置 5 min。加入 200 μ L 氯仿充分混匀, 室温静置 5 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液加等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温下保持 15 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用 70% 的乙醇洗涤沉淀。4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃去乙醇, 室温下沉淀, 充分干燥后溶于 20 μ L DEPC 处理的水中。

1.5 RT-PCR 检测

用 20 μ mol Oligo d(T)₁₈ 引物和 20 μ mol 随机引物。取病毒 RNA 5 μ L 并加入 20 μ mol Oligo d(T)₁₈ 引物和 20 μ mol 随机引物各 1 μ L, 混匀后 70 °C 热变性 5 min, 迅速置于冰上冷却, 然后加入 5 mmol dNTP 2 μ L、5×M-MLV 反转录酶缓冲液 6 μ L、40 U/ μ L RNase 抑制剂 0.5 μ L 和 200 U/ μ L M-MLV 反转录酶 0.5 μ L (TaKaRa 公司), 用 DEPC 处理的 H₂O 补足体积至 30 μ L。经过 30 °C 30 min, 42 °C 30 min, 72 °C 15 min 的反转录反应, 合成第一条 cDNA 链。

取反转录反应产物 2 μ L, 加入 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液 2 μ L、5 mmol dNTP 0.5 μ L、10 μ mol 上、下游引物各 0.5 μ L 和 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L (天根公司), 用灭菌超纯水补足体积至 20 μ L。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳。

1.6 序列测定和分析

将扩增的 PCR 产物送至上海生工生物工程公司进行测序, 用 DNAMAN 软件和 MEGA 5.04 软件对测序结果进行分析。系统进化树用 Neighbor-Joining 方法构建, 1000 bootstrap replicates 验证分枝, 根据遗传距离和 bootstrap 检验值进行分组。

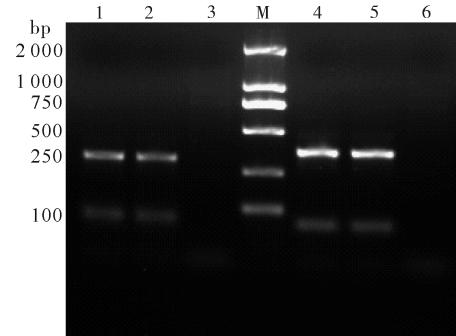
2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA 结果

在昆明市主要菊花生产企业嵩明虹华花卉公司和 3 个大型公园共采集黄色花叶、沿脉褪绿和枯斑等症状的菊花样品 269 份进行 DAS-ELISA 检测, 其中 TAV 检测为阳性的样品 3 份, 全部来自昆明大观公园, 发病率为 4.62%; CVB 检测为阳性的样品 8 份, 编号为 1、8、12、13、16、19、42、43, 全部来自嵩明虹华花卉公司, 发病率为 16.70%。

2.2 RT-PCR 检测

用 TAV1F/2R 和 CVB12F/13R 进行 RT-PCR 检测。电泳结果显示, 供试样品中 3 份样品为 TAV 阳性, 8 份样品为 CVB 阳性(图 1), 与 DAS-ELISA 检测结果一致。



M, DL 2 000 marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 1. TAV 阳性对照 TAV positive; 2. TAV 阳性样品 TAV positive sample; 3. 阴性对照 Healthy sample; 4. CVB 阳性对照 CVB positive; 5. CVB 阳性样品 CVB positive sample; 6. 阴性对照 Healthy sample.

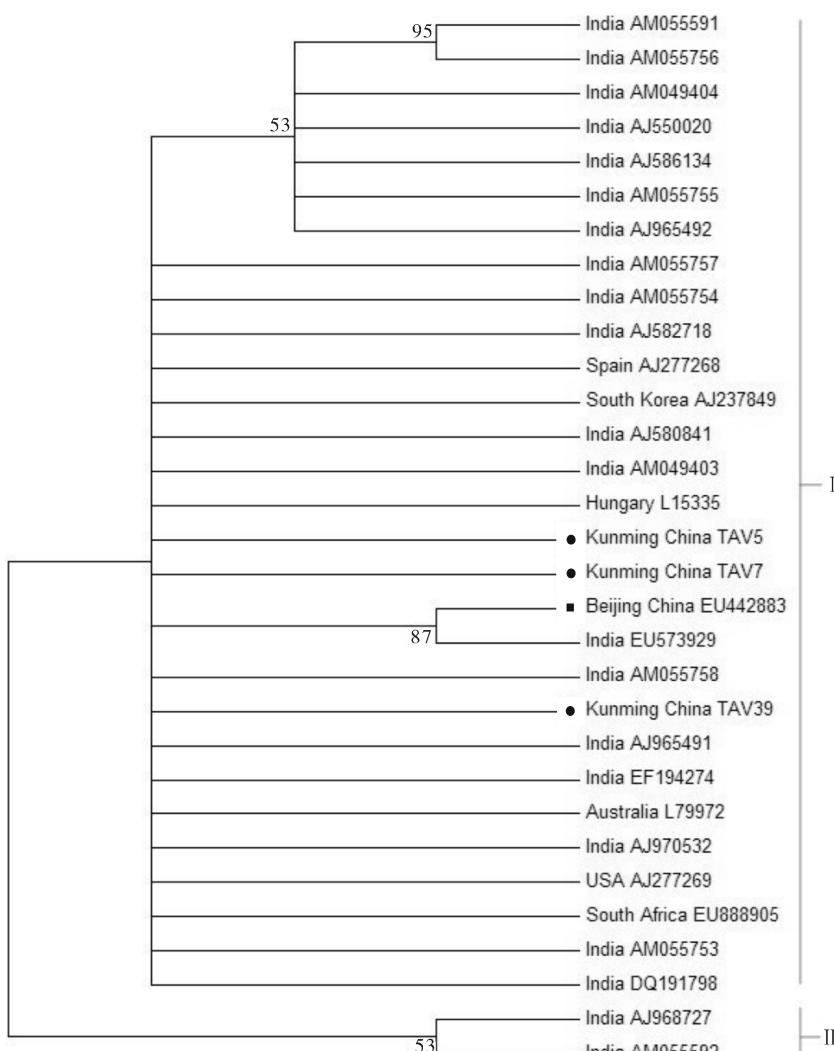
图 1 TAV 和 CVB 的 RT-PCR 检测产物电泳图

Fig. 1 RT-PCR detection of TAV and CVB

2.3 TAV 分离物序列的测定

对 3 个 TAV 阳性样品 (TAV5、TAV7 和 TAV39) 的 PCR 产物进行序列测定, 结果显示来自 3 个样品的 RT-PCR 产物大小均为 301 bp, 同源性高达 96.03%~98.68%。将所获序列与已发布的 28 条 TAV 分离物的 CP 序列进行比对, 同源性为 85.04%~98.02%, 表明 3 个扩增产物是 TAV 的部分 CP 核苷酸序列。这 3 个分离物分别与印度分离物 (AJ550020)、西班牙分离物 (AJ277268) 和 TAV7 的相似性最高, 为 98.01%~100.00%, 与北京分离物 (EU442883) 的同源性分别为 97.68%~98.43%。这 3 个 TAV 分离物和已报道分离物在基于 CP 基因核苷酸序列的系统进化树中聚为 2 个簇。

(I 和 II)(图 2)。印度分离物中 AJ968727 和 AM055592 形成簇 II,4 个中国分离物与其他亚洲、欧洲、澳大利亚和美国分离物分化为簇 I, 表明分离物的分化与其地理分布无显著关系。



线条长度表示遗传距离的长度, 数字代表 bootstrap 验证值, 圆形表示昆明分离物, 方形表示北京分离物。I 表示不同地域的分离物形成的簇, II 表示部分印度分离物形成的簇。The line length indicates the genetic distance, numbers show the bootstrap value. Circle indicates isolates of Kunming, square indicates isolates of Beijing. Isolates from different areas built up cluster I, the partial indian isolates built up cluster II.

图 2 TAV CP 核酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CP nucleic acid sequences of 31TAV isolates

2.4 CVB 分离物序列的测定

对 8 个 CVB 阳性样品(编号为 1、8、12、13、16、19、42、43)的 PCR 产物进行序列测定, 结果显示这 8 条序列大小均为 345 bp, 同源性为 80.05%~90.56%。其中 CVB1、CVB42 和 CVB43 序列的同源性为 100.00%, CVB13、CVB16 和 CVB19 的序列同源性较高, 为 96.63%; CVB12 与其他昆明分离物的同源性较低(85.75%), 与已报道的 35 条该病毒

对应序列同源性为 75.09%~84.99%。序列比对结果显示这段序列两端 1~19 nt 和 251~345 nt 区域保守型较高, 同源性分别达 97.85% 和 89.89%, 而中间 20~42 nt 和 143~170 nt 区域序列差异较大, 同源性仅为 70.45% 和 75.07%(图 3)。

系统进化树分析结果显示 43 条序列分为 3 簇, 与 Singh 等^[11]的分析结果相似(图 4)。这 8 条昆明分离物的序列与北京分离物序列都分布在簇 II。

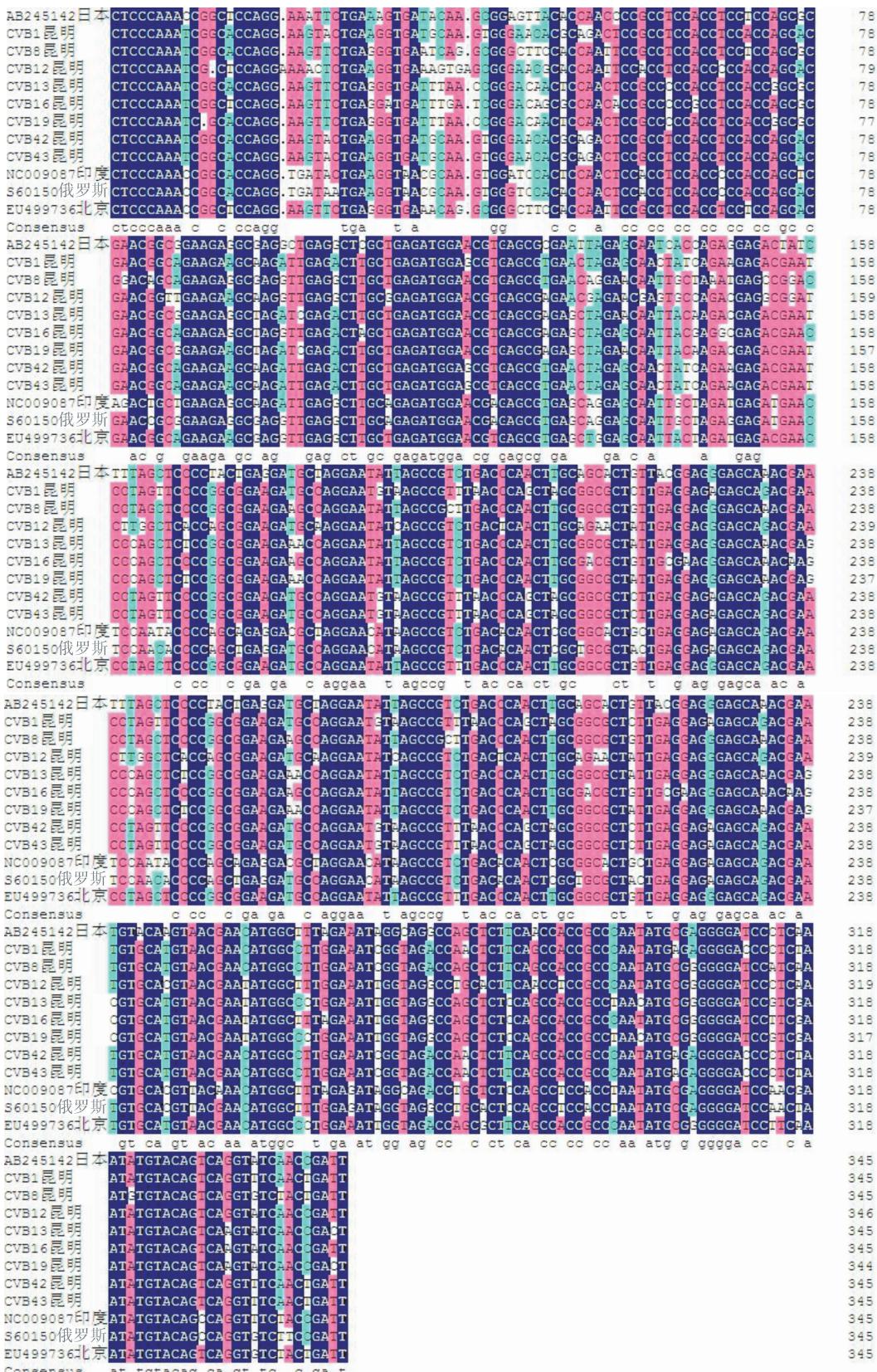
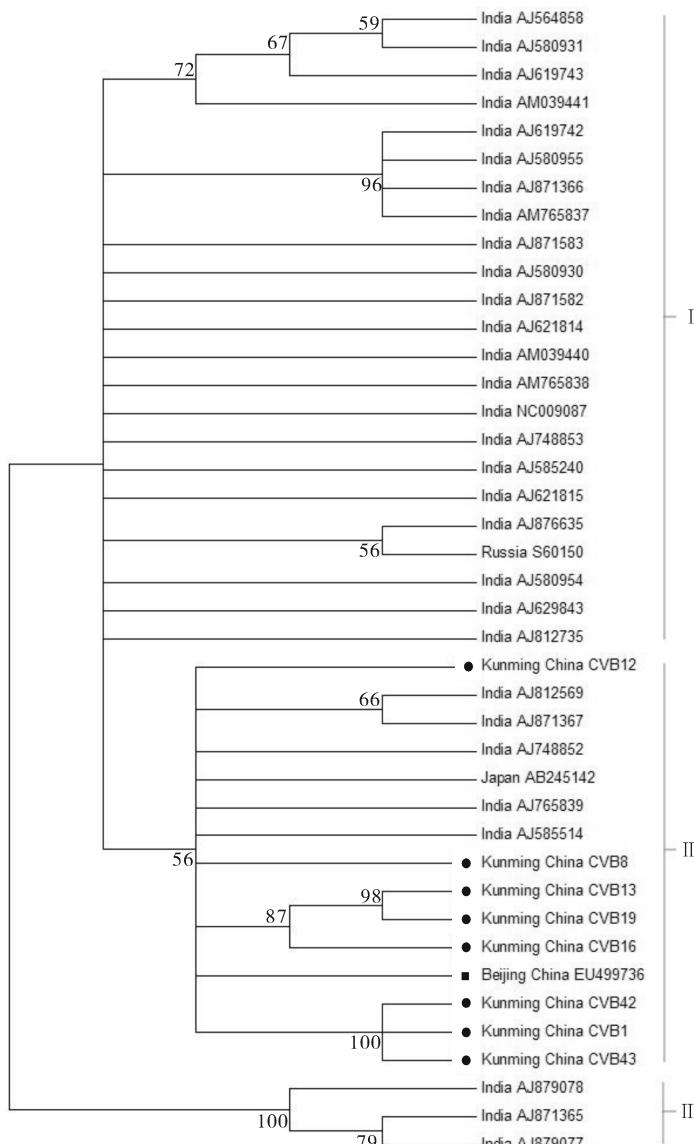


图 3 昆明分离物与不同地域 CVB CP 核苷酸序列同源性比较

Fig. 3 Comparison for CVB nucleic acid sequences homology in different areas



线条长度表示遗传距离的长度,数字代表 bootstrap 验证值,圆形表示昆明分离物,方形表示北京分离物。I 表示系统进化树形成的簇,II 表示昆明分离物和其他分离物形成的簇,III 表示部分印度分离物形成的簇。The line length indicates the genetic distance, numbers show the bootstrap value. Circle indicates isolates of Kunming . Square indicates isolates of Beijing. Isolates from different areas built up cluster I , Isolates of Kunming and others built up cluster II , the partial indian isolates built up cluster III.

图 4 CVB CP 核酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CP nucleic acid sequences of 43 CVB isolates

3 讨 论

本试验结果表明,田间病株症状为黄色花叶、沿脉褪绿和枯斑,与已报道的症状一致^[9]。2002 年,昆明地区菊花植株上 TAV 和 CVB 的发病率分别是 33% 和 53%^[4],由本试验结果可知,2 种病毒病的发病率分别降至 4.62% 和 16.70%,这表明 2 种病毒病害的发生和危害都显著降低,已从主要病害下降为次要病害。笔者首次对昆明地区 TAV 和

CVB 的分子变异情况进行了分析。系统发育进化树分析结果显示,尽管 TAV 和 CVB 2 种病毒 CP 序列的分子变异与地理位置无明显相关性,但 2 种病毒表现出完全不同的进化特点。TAV 各分离物间同源性较高,达到 98.68%。TAV 与同属的 CMV 之间存在基因重组和交叉保护现象^[11]。目前对 TAV 的 BJ 株系已完成了基因组的测定^[12],但其基因组功能、基因重组和致病机制还需进一步研究。CVB 的 CP 序列则存在高度变异区域(20~42 nt 和

143~170 nt区域),昆明8个分离物都来自同一公司的苗圃,在这一区域也存在变异。此外,Singh等^[9]报道CVB印度分离物UA2的CP序列来自于重组。这些都表明CVB具有很强的进化能力,而这些变异是否引起病毒致病力的变化尚无相关报道。在系统进化分析中,昆明分离物和北京分离物与UA2分别属于不同的簇中,没有发现具备相同的重组序列,也尚未发现有类似的重组现象发生。CVB的变异中是否存在重组现象还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张健如,沈淑琳.花卉植物病毒及病毒病[M].上海:上海科技出版社,1991.
- [2] 吴红芝,孔宝华,陈海如,等. RT-PCR检测菊花B病毒的研究[J].西南农业大学学报,2002,24(2):115-117.
- [3] 吴红芝,孔宝华,陈海如,等.侵染菊花的番茄不孕病毒的鉴定及其外壳蛋白基因克隆[J].中国病毒学,2002,17(2):145-148.
- [4] 吴红芝,孔宝华,陈海如,等.昆明地区菊花病毒病的调查与鉴定[J].云南农业大学学报,2002,17(1):24-27.
- [5] RAJ S K, KUMAR S, CHOUDHARI S. Identification of *Tomato aspermy virus* as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2007(2):1-2.
- [6] VERMA N, KUMAR K, KULSHRESTH S, et al. Molecular studies on *Tomato aspermy virus* isolates infecting chrysanthemums [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2009, 42(2):99-111.
- [7] 舒秀珍,朱水芳,胡伟贞,等.侵染菊花和风信子的番茄不孕病毒的鉴定[J].病毒学杂志,1990(2):186.
- [8] LEVAY K, ZAVRIEV S. Nucleotide sequence and gene organization of the 3-terminal *Chrysanthemum virus B* genomic RNA [J]. Journal of General Virology, 1991, 72:2333-2337.
- [9] SINGH L, HALLANL V, JABEENL N, et al. Coat protein gene diversity among *Chrysanthemum virus B* isolates from India [J]. Arch Virol, 2007, 152:405-413.
- [10] VERMA N, SHARMA A, RAJA R, et al. Detection identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India [J]. Crop Protection, 2003, 22:425-429.
- [11] THOPMSON J R, TEPFER M. The 3' untranslated region of *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgroup II RNA3 arose by interspecific recombination between CMV and *Tomato aspermy virus* [J]. Journal of General Virology, 2009, 90(9):2293-2298.
- [12] 施伟,金圣塔,张海峰,等.番茄不孕病毒BJ株系基因组测定与侵染性克隆[J].农业生物技术学报,2011,19(6):1120-1126.

Detection and sequence analysis of partial coat protein gene from two viruses in chrysanthemum

LEI Qiang^{1,2} LI Min¹ DING Yuan-ming¹ WANG Yun-yue²

1. Technical Center, Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,
Kunming 650228, China;

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

Abstract *Tomato aspermy virus* (TAV) and *Chrysanthemum virus B* (CVB) were detected after samples of chrysanthemum showing noticeable symptom of virus diseaseas were collected at flower bases and parks in Kunming in 2011. On the basis of ELISA test and RT-PCR detection, the resulted incidences of the TAV and CVB were 4.62% and 16.70% respectively. Partial coat protein (CP) gene in 3 isolates of TAV and 8 isolates of CVB were sequenced. The sequencing results indicate the homology between the 3 TAV isolates in Kunming and other 28 accessed isolates in GenBank is 85.04%-98.02%. These isolates were built up in two clusters in the phylogenetic tree, and the TAV isolates in Kunming were built up in the same cluster. However, a comparison between the 8 isolates of CVB in Kunming and the other known 35 isolates in GenBank indicates their homology is 75.09%-84.99%. These isolates were built up in three clusters in the phylogenetic tree, and the CVB isolates in Kunming were built up in the same cluster.

Key words chrysanthemum; *Tomato aspermy virus* (TAV); *Chrysanthemum virus B* (CVB); coat protein gene; phylogeny analysis

(责任编辑:陈红叶)