

袁志豪,李振锋,陆月霞,等.百合病毒的高通量测序鉴定和RT-PCR检测[J].华中农业大学学报,2022,41(3):157-163.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.018

百合病毒的高通量测序鉴定和RT-PCR检测

袁志豪,李振锋,陆月霞,蔡丽

华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070

摘要 为明确百合在生产中被病毒侵染的情况,利用高通量测序技术对云南、浙江等地的百合染病样品进行病毒鉴定,通过序列比对和拼接,获得了车前草花叶病毒(*plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV)、百合斑驳病毒(*lily mottle virus*, LMoV)、大丽花花叶病毒(*dahlia mosaic virus*, DMV)、黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV)、玄参花叶病毒(*figwort mosaic virus*, FMV)、玫瑰黄脉病毒(*rose yellow vein virus*, RYVV)、大丽花普通花叶病毒(*dahlia common mosaic virus*, DCMV)、木薯脉花叶病毒(*cassava vein mosaic virus*, CsVMV)等8种已知病毒和2种未知病毒的序列信息。对从云南、浙江、江西、上海、广东、湖南6个省(市)采集的48份百合样品进行了上述8种病毒的RT-PCR检测。结果显示,在百合样品中,DMV、RYVV、PIAMV和LMoV发生普遍,检出率均高于95%,FMV检出率高于85%,CMV检出率最低,且仅在云南省昆明市的样品中检出,而DCMV和CsVMV未检测到。检测样品中百合病毒复合侵染率为100%,单一样品检测出3~6种病毒,共有6种复合类型,以云南省昆明市的百合病毒复合侵染情况最复杂,昆明的单一样品均有5~6种病毒感染。以上结果表明,所检测地区百合病毒的检出率和复合侵染率都较高,因此,在生产中应实时监控和检测百合植株的带毒情况,及早发现染病植株,防止病毒扩散和传播,以免造成经济损失。

关键词 百合;病毒;高通量测序;RT-PCR检测;复合侵染

中图分类号 S432.4⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)03-0157-07

百合(*Lilium* spp.)为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)的多年生草本植物,具有观赏价值、药用价值和食用价值^[1]。近年来我国百合种植业飞速发展,国内观赏百合种植面积迅速增加,主要分布于云南、四川、西藏、贵州、吉林、湖北、陕西、辽宁、河北、黑龙江、内蒙古、甘肃、江西、浙江等省(区)^[2]。然而,栽培过程中,百合常受到各种病害的侵染,常见病害有叶枯病、病毒病、鳞茎基腐病等^[3],其中,百合病毒病已经严重影响了百合的产量和品质。百合受病毒侵染常见的症状类型有轻花叶型、重花叶型、矮化型、丛簇矮化型、黄化矮化型、扁茎簇叶型、花变叶型等^[4]。另一方面,随着从国外引进种球的数量和批次数目的增长,一些危害性大的检疫性病毒传入我国的风险也逐渐增大^[5]。

目前国内外报道侵染百合的病毒有20多种(包括1种植原体),其中危害较严重、发生最普遍的有百

合斑驳病毒(*lily mottle virus*, LMoV)、百合无症状病毒(*lily symptomless virus*, LSV)和黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV),常表现为复合侵染^[6-7]。我国已报道的侵染百合的病毒有11种:包括车前草花叶病毒(*plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV)^[8]、剪秋萝斑驳病毒(*lychnis mottle virus*, LycMoV)、百合黄脉病毒(*lily yellow vein virus*, LYVV)、百合内生病毒(*lily endomavirus*, LEV)^[9]、百合卷叶病毒(*lily polerovirus virus*, LPV)^[9]、百合黄化花叶病毒(*lily yellow mosaic virus*, LYMV)^[10]、李属坏死环斑病毒(*prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)^[11]、CMV^[12]、LMoV^[13]、LSV^[14]、南芥菜花叶病毒(*arabis mosaic virus*, ArMV)^[15],在这些病毒中,CMV、LSV、LMoV和PIAMV是侵染百合植株的主要病毒^[16]。

百合属于无性繁殖,病毒可通过种球传给后代,在田间也可以通过蚜虫或汁液接触传播扩散。病毒

收稿日期:2022-02-22

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1001800)

袁志豪,E-mail:835219221@qq.com

通信作者:蔡丽,E-mail:caili@mail.hzau.edu.cn

主要侵染百合的鳞茎、叶片、花等部位,病情严重时会对百合生产造成巨大的经济损失^[17]。所以,加强百合病毒的检测和监控是十分必要的,对病毒的防控、无毒苗生产和海关检疫等方面是必需的。

本研究从我国云南、浙江、江西、广东、湖南和上海6个地区采集疑似感染病毒的百合叶片,从中提取总RNA,通过高通量测序、生物信息学分析和RT-PCR等技术,检测侵染百合的病毒,分析不同病毒的发生率、地区分布和复合侵染情况等,旨在为百合无病毒种球和种苗的生产以及病毒病的综合防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 病样采集

2020年9月至2021年12月,从云南、浙江、江西、上海、广东、湖南6个地区,共采集表现疑似病毒症状的百合叶片样品48份(表1),置于超低温冰箱保存备用。

表1 百合样品信息

Table 1 Information of lily samples

采集地区 Collection location	样品数 Number of samples	样品编号 Sample No.	采集时间 Collection time
云南省昆明市 Kunming, Yunnan Province	9	YN1-9	2020-09-05
浙江省海宁市 Haining, Zhejiang Province	7	ZJ-HN1-7	2020-10-24
浙江省杭州市 Hangzhou, Zhejiang Province	6	ZJ-HZ1-6	2020-10-25
上海市辰山植物园 Shanghai Chenshan Botanical Garden	1	SH-1	2021-04-17
江西省万载县 Wanzai County, Jiangxi Province	3	JX-WZ1-3	2021-04-23
湖南省湘潭市 Xiangtan, Hunan Province	5	HN-XT1-5	2021-05-25
湖南省长沙植物园 Changsha Botanical Garden, Hunan Province	2	HN-CS1-2	2021-05-25
广东省佛山市 Foshan, Guangdong Province	15	GD1-15	2021-12-02

1.2 主要试剂

植物总RNA提取试剂盒、第一链cDNA合成试剂盒、2×Accurate Taq Master Mix (dye plus)、GL DNA Marker 100 Ladder、DNA胶回收试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司,感受态大肠杆菌DH5α购自北京擎科生物科技有限公司,TA快速克隆试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.3 总RNA的提取

百合发病叶片总RNA的提取参照试剂盒使用说明进行,提取的总RNA经琼脂糖凝胶电泳检测并使用紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度。

反转录参照第一链cDNA合成试剂盒说明操作。病毒RT-PCR特异性检测引物(表2)由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 高通量测序与数据分析

百合样品按云南省和浙江省2个地区,不同症状进行混合,送贝瑞基因公司进行高通量测序。

1)文库构建。植物总RNA检测合格后,通过去核糖体RNA试剂盒(Ribo-off® rRNA depletion kit, Vazyme Biotech Co., Ltd)去除rRNA。随后加入缓冲液将mRNA打断成短片段,以mRNA为模板,用六碱基随机引物合成一链cDNA,然后加入缓冲液、dNTPs和DNA polymerase I和RNase H合成二链cDNA,再用AMPure XP beads纯化双链cDNA。纯化的双链cDNA先进行末端修复、加A尾并连接测序接头,再用AMPure XP beads进行片段大小选择。最后进行PCR扩增,并用AMPure XP beads纯化PCR产物,得到最终的文库。

2)文库定量。文库构建完成后,先使用Qubit 2.0进行初步定量,稀释文库至2 ng/μL,随后使用Agilent 2100对文库的插入大小进行检测,插入大小符合预期后,使用Q-PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol/L),以保证文库质量。

3)上机测序。文库质量经检测合格后,用Illumina Novaseq平台进行测序。

4)数据质控与分析。将高通量测序返回的reads进行统计分析,去除低质量、含有接头的reads,然后针对每个样品经预处理得到的Clean reads,采用ID-BA_UD^[18]对clean reads进行拼接($K=19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119$),得到contig,通过与Nr (NCBI non-redundant protein sequences)库进行Blast比对(e 值 $\leq 10^{-3}$)。由于每条序列可能会有多

表2 用于百合病毒RT-PCR检测的引物信息

Table 2 Information of primers used for virus RT-PCR detection

病毒 Viruses	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/℃ Temperature	扩增产物/bp Product
CMV	F:TGTACCAGTGCCCGTGTTTT R:CCTACTCTCTTGTGACCGCT	52	436
PIAMV	F:ACGCAGTCATGCTTTAC R:GCCCAGGAAGATTTTAGG	52	296
LMoV	F:GTTCCAGGCAAATGAGACACT R:GTGCTAGATTGAAGTCGGTGAG	52	623
FMV	F:GTTTCCCTTGCTGCTCCTAA R:CCGGGATTTTTCGAGCTTCCT	58	817
DMV	F:TGAGATGGCAGATGTGATT R:GTGGAGGTAGAAGTTGTAGGT	52	681
DCMV	F:TTTATTAGGAGGCAGGGTG R:GTGTATGGCTGGATTGGTT	52	335
CsVMV	F:TAGCAACACAAGAAGACGAA R:GTATCTGCAAATGTGTTCTC	48	327
RYVV	F:GAAATCAAGAGTCGGAAG R:TGGTGCTGGAATACTAAAA	47	543

个比对结果,得到多个不同的分类级别,为了保证其生物学意义,采取LCA算法,将出现第一个分支前的分类级别,作为该序列的物种注释信息。对注释到的Nr数据库的contig与NCBI Taxonomic数据库进行注释,获取分类地位,最后提取注释到病毒的contig,将contig在NCBI中进行Blastn和BlastX搜索比对,将比对到病毒的序列及病毒种类整理汇总。

1.5 RT-PCR验证及数据统计

根据注释到的病毒contig,利用Primer Premier 5软件设计特异性引物检测样品中的病毒。提取百合样品的总DNA和总RNA。提取的RNA在反转录酶作用下利用随机引物合成第一条cDNA链。用DNA聚合酶和特异性引物进行PCR反应。50 μL反应体系包含2 × Accurate Taq Master Mix (dye plus) 25 μL, ddH₂O 20 μL, cDNA 2 μL, 引物F 1.5 μL, 引物R 1.5 μL; PCR扩增程序为94 °C预变性30 s, 98 °C变性10 s, 退火30 s, 72 °C延伸60 s, 35个循环; 72 °C最后延伸2 min。PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳分离, 割胶回收目标片段, 经DNA纯化试剂盒纯化后连入One step ZTOPO-Blunt/TA载体, 转入大肠杆菌DH5α, 阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。RT-PCR检测后统计分析侵染百合病毒的种类、病毒侵染率、各地区病毒分布情况和病毒复合侵染情况等。

2 结果与分析

2.1 百合病毒病主要症状

2020年9月至2021年12月,从6个地区共采集表现疑似病毒症状的百合叶片样品48份,感病植株主要表现为花叶、黄化、皱缩、畸形、矮化等症状(图1)。



图1 百合病毒病田间症状类型

Fig.1 Symptom types of lily virus disease in the field

2.2 高通量测序及分析

将最早采于云南和浙江两省表现不同症状的百合叶片RNA混合,进行转录组测序。对测序数据进行分析,共获得109 041 624对clean reads。其中云南样品(BH-YN)得到55 080 214对clean reads,占reads总数的98.40%,拼接后得到142 767条contigs,注释到病毒相关的有1 719条contigs,302 912个碱

基;浙江样品(BH-ZJ)得到 53 961 410 对 clean reads,占reads总数的98.35%,拼接后得到165 202条 contigs,注释到病毒相关的有1 278条 contigs,224 321个碱基。

比对到病毒序列的 contigs 包括:8条注释为

CMV,456条注释为 PIAMV,1 534条注释为 LMoV,11条注释为 DMV,39条注释为 RYVV,6条注释为 FMV,2条注释为 DCMV,1条注释为 CsVMV,2条 contig 未比对到已知病毒,可能是新病毒(表3)。

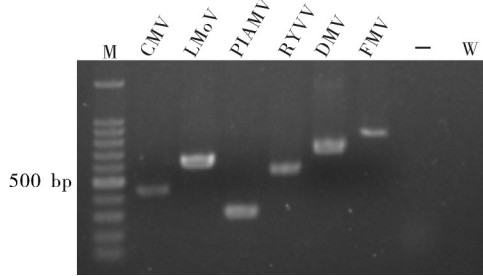
表3 百合测序结果中比对到的8种已知病毒

Table 3 Parameters of contigs of eight known viruses from lily sequencing results

病毒名称 Virus name	contig 数量 contig number	contigs 长度范围/bp Range of length of contigs	参考序列 Reference sequence	覆盖率/% Coverage rate
CMV	8	114~1 920	AJ276583.1	100
PIAMV	456	100~1 431	KU159091.1	100
LMoV	1 534	100~1 311	GU440578.1	13
DMV	11	330~4 568	HQ336478.1	56
RYVV	39	321~3 644	YP_007761643.1	34
FMV	6	316~2 924	AAA43816.1	62
DCMV	2	342~593	BAS06273.1	24
CsVMV	1	603	NP_056848.1	36

2.3 RT-PCR 验证

根据测序分析获得的8种病毒的序列,以及设计合成的每种病毒的特异性引物,利用RT-PCR对测序结果中的已知病毒进行验证。结果显示,在百合样品中扩增到了与CMV、PIAMV、LMoV、DMV、FMV、RYVV 6种病毒预期相符的条带,而未扩增到DCMV和CsVMV相应的条带(图2)。对进一步验证中得到的百合样品中的6种病毒扩增条带进行克隆和测序分析,结果显示测序正确,符合预期大小。



M:DNA Marker 100 Ladder; -:阴性对照 Negative control; W:水 Water.

图2 百合6种病毒RT-PCR扩增结果
Fig.2 Results of RT-PCR amplification of 6 viruses from lily

对采集的48份样品进行了上述6种病毒的RT-PCR检测,结果显示:6种病毒的检出率从14.58%~100%不等。其中,DMV和RYVV的检出率最高,均为100%,其次是PIAMV和LMoV,检出率均为95.83%,然后是FMV,检出率为85.42%,检出率最

低的是CMV,为14.58%。

2.4 百合病毒的分布及复合侵染情况

对6个地区的病毒分布进行统计,结果显示:云南地区6种病毒都有,上海市有3种,其他地区存在4~5种病毒,不同地区侵染百合的病毒种类差别不大。其中,CMV只在云南地区检测出,LMoV、DMV和RYVV在6个地区都存在,表明这3种病毒分布范围最广(表4),发生最普遍。

表4 我国6个地区检出的百合病毒

Table 4 Lily viruses detected in 6 regions of China

采集地 Collection location	检出的病毒 Positive viruses
云南省昆明市 Kunming, Yunnan Province	CMV,PIAMV,LMoV, DMV,RYVV,FMV
浙江省海宁市 Haining, Zhejiang Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV,FMV
浙江省杭州市 Hangzhou, Zhejiang Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV,FMV
上海市辰山植物园 Shanghai Chen Shan Botanical Garden	LMoV,DMV,RYVV
江西省万载县 Wanzai County, Jiangxi Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV
湖南省湘潭市 Xiangtan, Hunan Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV,FMV
湖南省长沙植物园 Changsha Botanical Garden, Hunan Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV,FMV
广东省佛山市 Foshan, Guangdong Province	PIAMV,LMoV,DMV, RYVV,FMV

对6种病毒的复合侵染情况进行统计,结果显示:百合单个样品可检测出3~6种病毒,其中仅有1个样品检测到3种病毒复合侵染,LMoV、DMV、RYVV 3种病毒复合侵染率最低,为2.08%;LMoV、PIAMV、DMV、RYVV和FMV 5种病毒复合侵染率

最高,为62.50%;6种病毒复合侵染的样品有7个,复合侵染率为14.58%,表明田间自然发病存在普遍的复合侵染现象。从病样采集地来看,云南地区的百合病毒复合侵染现象最复杂,存在6种复合侵染类型,详情见表5。

表5 48份百合样品中6种病毒复合侵染情况

Table 5 Mixed infection of 6 viruses in 48 lily samples

病毒复合侵染类型 Types of virus mixed infection	分布 Distribution	样品数 Number of samples	复合侵染率/% Mixed infection rate
LMoV+DMV+RYVV	上海市 Shanghai	1	2.08
LMoV+PIAMV+ DMV+RYVV	浙江省海宁市、江西省万载县、广东省佛山市 Haining, Zhejiang Province; Wanzai County, Jiangxi Province; Foshan, Guangdong Province	6	12.50
LMoV+DMV+ RYVV+FMV	广东省佛山市 Foshan, Guangdong Province	2	4.17
PIAMV+DMV+ RYVV+FMV	广东省佛山市 Foshan, Guangdong Province	2	4.17
LMoV+PIAMV+ DMV+RYVV+ FMV	云南省昆明市、浙江省海宁市和杭州市、湖南省湘潭市和长沙市、广东省佛山市 Kunming, Yunnan Province; Haining and Hangzhou, Zhejiang Province; Xiangtan and Changsha, Hunan Province; Foshan, Guangdong Province	30	62.50
CMV+LMoV+ PIAMV+DMV+ RYVV+FMV	云南省昆明市 Kunming, Yunnan Province	7	14.58

3 讨论

本研究通过对疑似百合病毒病样品进行转录组测序,分析得到LMoV、CMV、PIAMV、DMV、FMV、RYVV、DCMV、CsVMV 8种已知病毒和2种未知病毒的序列信息。利用RT-PCR在百合样品中检测到除DCMV和CsVMV以外的6种病毒。在已知病毒中,DMV和RYVV在所有样品中均有检出,检出率最低的是CMV,且仅在云南昆明市的样品中检出。LMoV、DMV和RYVV分布范围最广,在6个地区都有分布。

我们的检测结果与前人的报道既有相同之处,又有所不同。CMV、LMoV和LSV被认为是百合上的三大病毒,很多研究直接利用ELISA法或者RT-PCR技术检测这3种病毒。王连春等^[19]对侵染云南食用百合的病毒进行检测,发现CMV、LSV和LMoV的检出率分别为60%、50%和30%,且CMV和LSV的复合侵染率为20%,本研究在云南样品中检测出CMV和LMoV,未检测出LSV。江西万载县的百合叶片中检测出PIAMV、LMoV、DMV和RYVV 4种病毒,未检测出CMV和LSV;叶晓梦等^[12]采用多重RT-PCR技术对江西省莲花县的百合叶片所携带的上述3种病毒检测,结果显示含有

CMV和LMoV;谢晚彬等^[13]采用RT-PCR技术在江西万载县的龙牙百合鳞茎中对CMV、LMoV和LSV的检测结果表明,3种病毒中仅有LMoV呈阳性;本研究中浙江海宁市和杭州市百合叶片中检测出了PIAMV、LMoV、DMV、RYVV和FMV 5种病毒,未检测出CMV;而沈嘉乐等^[20]采用间接ELISA法对浙江杭州市从荷兰引进的百合和杭州本地栽种的百合样品进行检测,结果表明,LMoV和LSV均有发现,且LSV侵染样品均为与LMoV复合侵染。刘文洪^[11]在进口百合和我国浙江丽水栽培百合样品中检测到PNRSV的发生,侵染率为20.8%,这是PNRSV侵染百合的首次报道,证明百合是PNRSV的一个新寄主。综上所述,即便是相同地区百合病毒的检测结果也有差异,可能是由于采样的病毒样品类型、样品数量或者检测时取样部位等不同造成的,也可能是检测方法的灵敏度或者病毒株系变异引起的。

由本研究检测结果还可以看出,百合病毒在田间存在严重的复合侵染现象,单个样品中能同时检出3~6种病毒,且以LMoV、PIAMV、DMV、RYVV和FMV 5种病毒复合侵染率最高,48份样品中有30份为上述5种病毒复合侵染,复合侵染率高达62.50%。被誉为“春城”的云南省昆明市,由于其独

特的气候环境,四季如春,一年四季可不间断种植各种蔬菜和花卉,特别有利于病毒侵染及传播。因此,云南地区的百合病毒复合侵染现象最复杂,单个样品被5~6种病毒复合侵染,其中6种病毒复合侵染率为14.58%。多种病毒复合侵染百合,还有些病毒侵染后并不表现症状,很难单从症状上进行正确诊断。病毒复合侵染已成为百合脱毒生产中的重大障碍,而且脱毒苗的检测大多仅针对已知病毒,对未知的新病毒则无法检测。我们对百合样品进行分析时发现2种未知病毒,新病毒的全长序列和分类地位有待进一步确认。因此,在全国范围内广泛采样,研究侵染百合的病毒种类及特性,尤其是对新病毒的鉴定和检测,将对百合脱毒生产及病毒病防控有重大意义。

致谢:感谢江西省农业科学院蔬菜花卉研究所的黄冬华研究员、罗云博士和李艳婷博士在百合病毒样品采集中提供的帮助。

参考文献 References

- [1] 源朝政,陈海霞,吕长平,等.百合病毒病检测技术研究进展[J].湖南农业学报,2013(9):77-80.YUAN C Z, CHEN H X, LÜ C P, et al. Advances in detection technology for virus in lily[J]. Hunan agricultural sciences, 2013(9): 77-80 (in Chinese with English abstract).
- [2] 李玉萍,龚妍春,吴光杰,等.百合属植物资源的分布、利用价值及其开发前景展望[J].安徽农业科学,2010,38(7):3395-3396, 3399.LI Y P, GONG Y C, WU G J, et al. Application values, distribution and development prospect of *Lilium* resource[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2010, 38(7): 3395-3396, 3399 (in Chinese with English abstract).
- [3] 李铁军,郁伟.百合主要病害的识别与防治[J].农业科技通讯,2002(1):30-31.LI T J, YU W. Identification and prevention of main diseases of lily[J]. Bulletin of agricultural science and technology, 2002(1): 30-31 (in Chinese).
- [4] 徐秉良,梁巧兰,徐琼.百合病毒病的发生与症状类型[J].植物保护,2004,30(5):62-65.XU B L, LIANG Q L, XU Q. Occurrence and the types of symptoms of lily virus diseases[J]. Plant protection, 2004, 30(5): 62-65 (in Chinese with English abstract).
- [5] 王继华,瞿素萍,孔宝华,等.百合无症病毒的RT-PCR和IC-RT-PCR检测[J].云南农业大学学报,2004,19(2):148-150, 173.WANG J H, QU S P, KONG B H, et al. Detection of lily symptomless virus by RT-PCR and IC-RT-PCR[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2004, 19(2): 148-150, 173 (in Chinese with English abstract).
- [6] 廖富荣,林石明,吴媛,等.侵染百合的病毒种类及其检疫重要性[J].植物检疫,2011,25(1):70-74.LIAO F R, LIN S M, WU Y, et al. The viruses infecting lily (*Lilium* spp.) and their phytosanitary significance[J]. Plant quarantine, 2011, 25(1): 70-74 (in Chinese with English abstract).
- [7] 沈淑琳.百合病毒病及其检验[J].植物检疫,1996,10(4):223-226.SHEN S L. Lily virus disease detection[J]. Plant quarantine, 1996, 10(4): 70-74 (in Chinese).
- [8] 宋蒙,徐雷锋,曹雨薇,等.百合中车前草花叶病毒的实时荧光定量PCR检测[J].园艺学报,2021,48(12):2497-2505.SONG M, XU L F, CAO Y W, et al. Real-time fluorescence quantitative PCR detection of plantago asiatica mosaic virus in lilies[J]. Acta horticulturae sinica, 2021, 48(12): 2497-2505 (in Chinese with English abstract).
- [9] 闫晨鸽.利用深度测序技术鉴定枣树及百合病毒[D].北京:北京农学院,2020.YAN C G. Identification of jujube and lily viruses by deep sequencing technology[D]. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [10] LI Y Q, JIA A, QIAO Y, et al. Virome analysis of lily plants reveals a new potyvirus[J]. Archives of virology, 2018, 163(4): 1079-1082.
- [11] 刘文洪.百合病毒的分子鉴定及重要病毒的检测研究[D].杭州:浙江大学,2003.LIU W H. Molecular identification of viruses infecting lily and detection of important viruses[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003 (in Chinese with English abstract).
- [12] 叶晓梦,曾帅,石绪根,等.江西省莲花县百合病毒病分子鉴定[J].生物灾害科学,2021,44(2):146-149.YE X M, ZENG S, SHI X G, et al. Molecular identification of lily viruses in Lianhua County, Jiangxi Province[J]. Biological disaster science, 2021, 44(2): 146-149 (in Chinese with English abstract).
- [13] 谢晚彬,丁永电.万载龙牙百合主要病毒的检测及其检测技术的建立[J].江西农业学报,2018,30(2):105-107, 111.XIE W B, DING Y D. Detection of main viruses of *Lilium brownii* var. *viridulum* in Wanzai and establishment of their detection technology[J]. Acta agriculturae Jiangxi, 2018, 30(2): 105-107, 111 (in Chinese with English abstract).
- [14] 王红梅,王立光,刘新星,等.兰州百合病毒RT-PCR检测技术建立及应用[J].甘肃农业科技,2021,52(3):38-43.WANG H M, WANG L G, LIU X X, et al. Establishment and application of virus detection technology of *Lilium davidii* Var. *unicolor* [J]. Gansu agricultural science and technology, 2021, 52(3): 38-43 (in Chinese with English abstract).
- [15] ZHANG Y B, WANG Y J, XIE Z K, et al. Rapid detection of lily mottle virus and arabis mosaic virus infecting lily (*Lilium* spp.) using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. The plant pathology journal, 2020, 36(2): 170-178.
- [16] KWON J Y, RYU K H, CHOI S H. Reverse transcription polymerase chain reaction-based system for simultaneous detection of multiple lily-infecting viruses [J]. The plant pathology journal, 2013, 29(3): 338-343.
- [17] 王继华,王丽花,丁元明,等.应用多重RT-PCR检测百合无症病毒和百合斑驳病毒[J].园艺学报,2005,32(2):284-287.WANG J H, WANG L H, DING Y M, et al. Detection of lily symptomless virus and lily mottle virus by multiplex RT-PCR [J]. Acta horticulturae sinica, 2005, 32(2): 284-287 (in Chinese with English abstract).
- [18] PENG Y, LEUNG HENRY C M, YIU S M, et al. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing

- data with highly uneven depth[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(11): 1420-1428.
- [19] 王连春,孔宝华,赵丹,等.云南食用百合病毒病的发生与检测[J]. *云南农业大学学报*, 2009, 24(4): 518-521. WANG L C, KONG B H, ZHAO D, et al. Occurrence and detection of viruses infecting Yunnan edible lily [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2009, 24(4): 518-521 (in Chinese with English abstract).
- [20] 沈嘉乐,郑红英,陈炯,等.三种百合线状病毒的外壳蛋白抗血清制备[J]. *科技通报*, 2007, 23(2): 219-224. SHEN J L, ZHENG H Y, CHEN J, et al. The preparation of antisera to the coat proteins of three filamentous viruses infecting lily plants [J]. *Bulletin of science and technology*, 2007, 23(2): 219-224 (in Chinese with English abstract).

Identification and detection of lily virus by high-throughput sequencing and RT-PCR

YUAN Zhihao, LI Zhenfeng, LU Yuexia, CAI Li

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to clarify the virus infection of lily in production, virus-infected lily samples collected from Yunnan and Zhejiang Provinces were analyzed by using high-throughput sequencing technique. Eight known viruses, including lily mottle virus (LMoV), cucumber mosaic virus (CMV), plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), dahlia mosaic virus (DMV), figwort mosaic virus (FMV), rose yellow vein mosaic virus (RYVV), dahlia common mosaic virus (DCMV), and cassava vein mosaic virus (CsVMV), and two new viruses were identified through sequence alignment and assembly. Then 48 lily samples collected from Yunnan, Zhejiang, Jiangxi, Shanghai, Guangdong and Hunan Provinces were detected using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that DMV, RYVV, PIAMV and LMoV were predominant and the positive detection rates of them were above 95%. The positive rate of FMV was higher than 85%, while that of CMV was the lowest, which was only positive in the samples from Kunming, Yunnan Province. DCMV and CsVMV were not detected in these samples. The mixed infection rate of lily virus was 100%, and 3-6 viruses were positive in a single sample, with a total of 6 mix types. The mixed infection of lily virus in Kunming, Yunnan Province was the most complicated. A single sample from Kunming was infected with 5-6 viruses. These results indicated that the detection rate and the mixed infection rate of lily viruses were both high in the detected areas. Therefore, it is necessary to monitor and detect the viruses that infected lily plants as early as possible to prevent the transmission of viruses and avoid economic losses.

Keywords lily; virus; high-throughput sequencing; RT-PCR detection; mixed infection

(责任编辑:边书京)