

露兜树感染黄瓜花叶病毒的鉴定

王凯利^{1,2}, 张洁², 吴阔², 杨学宝³, 魏建丽², 王昌命^{1,*}, 董家红^{2,4,*}

(¹西南林业大学生命科学学院, 昆明 650224; ²云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223;
³元江县农业技术推广站, 云南玉溪 653100; ⁴云南中医药大学中药学院, 昆明 650500)

摘要: 为了确定引起云南元江露兜树 (*Pandanus tectorius*) 叶片黄化、花叶斑点的病毒病原。取症状明显的叶片进行负染, 经电镜观察到病毒粒子形态为球形, 直径约为 30 nm。使用黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因序列特异性引物, 对露兜树上的病毒分离物进行病毒基因 RT-PCR 扩增分析, 克隆、测序目的片段, 发现其与印度、中国四川、泰国的黄瓜花叶病毒分离物的外壳蛋白基因序列相似性为 98%, 属于 CMV 亚组 I。这是露兜树被病毒感染的首次报道。

关键词: 露兜树; 黄瓜花叶病毒; 病毒粒子; 外壳蛋白基因; 侵染

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 10-2055-06

Identification of *Cucumber mosaic virus* Infecting *Pandanus tectorius*

WANG Kaili^{1,2}, ZHANG Jie², WU Kuo², YANG Xuebao³, WEI Jianli², WANG Changming^{1,*}, and DONG Jiahong^{2,4,*}

(¹Southwest Forestry University, College of Life Sciences, Kunming 650224, China; ²Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; ³Yuanjiang County Agricultural Technology Extension Station, Yuxi 653100, China; ⁴College of Traditional Chinese Pharmacy, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to confirm the viral pathogen causing yellowing and mosaic spots symptoms in the leaves of *Pandanus tectorius* in Yuanjiang County, Yunnan Province. Electron microscopy revealed that the virus in the dips of the diseased leaves has icosahedral particles ca. 30 nm in diameter. With the specific primer pairs for coat protein (CP) gene sequence of *Cucumber mosaic virus* (CMV), RT-PCR was used to detect the viral pathogen infection to *P. tectorius* and the target fragment was cloned and sequenced. The sequence analysis showed that it had the highest identity of 98% with CP gene sequence of CMV isolates from Indian, Sichuan and Thailand. This isolate belongs to CMV subgroup I. It is the first report of infection of *P. tectorius* by a viral pathogen.

Keywords: *Pandanus tectorius*; *Cucumber mosaic virus*; viral particle; coat protein gene; infection

露兜树 (*Pandanus tectorius*) 是常绿观赏植物, 属于露兜树科 (Pandanaeae), 气根多生植物, 原产中南太平洋的波里尼西亚及其它诸岛屿, 约有 700 种 (Zhang et al., 2012)。主要分布于热带地区, 也分布于亚洲热带、澳大利亚南部。在我国福建、台湾、广东、海南、广西、贵州和云南等地

收稿日期: 2019-06-05; 修回日期: 2019-07-08

基金项目: 云南省方荣祥院士工作站; 云南省应用基础研究计划重点项目 (2017FA019)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: dongjhn@126.com, 1563036678@qq.com)

都有引种栽培。露兜树具有较高的使用价值,叶纤维可编制席、帽等工艺品;嫩芽可食;根与果实入药,有治疗感冒发热、肾炎、水肿、腰腿痛、疝气痛等功效(彭丽华,2011);鲜花可提取芳香油。露兜树喜阴,易受病原菌的侵染。2017年在云南元江观察到露兜树的叶片出现黄化斑点、花叶、褪绿等症状,通过症状观察露兜树可能感染了病毒病。

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*)黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)的成员,是一种世界性病毒,寄主范围最多,可感染1 000多种单子叶和双子叶植物。最常见的寄主有烟草、辣椒、番茄、玉米,但没有侵染露兜树的相关报道。黄瓜花叶病毒的主要传播介体为蚜虫,能够以非持久性传毒方式传播该病毒,蚜虫较多时会造成发病高峰。CMV的分离物不同基因的差距很大,根据CP基因进行了序列分析和比较分为两个亚组:亚组I和II。而目前在中国发现的CMV,分子鉴定结果发现主要是亚组I,而亚组II发现的相对较少。

本研究通过负染观察病毒粒子以及RT-PCR等鉴定了引起云南元江露兜树黄化、褪绿斑病的病原,确定露兜树是否感染了CMV。

1 材料与方法

1.1 植物样品的采集

2017年在云南元江观察到露兜树的叶片出现黄化斑点、花叶、褪绿等症状,该区域共有8株,均采集有症状的叶片,保存于-80℃备用。

1.2 病毒分离和电镜负染色观察

采取症状明显的叶片组织,放在已灭菌的研钵中并加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0),充分研磨;在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)的叶片上均匀洒上少量的金刚砂,用棉签蘸取少量汁液在洒有金刚砂的叶片上轻轻摩擦2~3次,5 min之后用水轻轻的清洗叶面,并标记接种样品和时间。实验共设置了3个重复,每次接种5株本氏烟,5~7 d后,对样品进行电镜观察。

病毒粒子的负染色观察,参照方琦等(2013)的方法,取0.1 g感病的本氏烟叶片置于载玻片上,滴加10 μL 2.5%的戊二醛,用刀片切碎(在切的过程中保持叶片湿润,及时滴加2.5%的戊二醛),将铜网有膜的一面倒扣在叶片浸出液表面3 min,然后用滤纸将铜网表面的液体吸干,将铜网有膜的一面扣于染色剂(钨氨酸或磷钨酸)液体表面2 min,充分染色,用吸水纸将铜网表面的液体吸干,置于红外灯下烘烤15 min,烘干后在透射电镜(FEI TECNAI G2, USA)下观察。

1.3 RT-PCR 扩增病毒基因

引物的设计:根据NCBI中CMV-CP(DQ459482)的序列用软件primer 5进行引物设计,正向引物CMV-CPF: 5'-ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTG-3',反向引物CMV-CPR: 5'-TCAAACCTGGAGCACCCCAGATG-3',送昆明擎科生物技术有限公司进行合成。

使用TRIzol法(TaKaRa)提取有症状的露兜树叶片的总RNA:取0.1 g感病的露兜树叶片,加入液氮充分研磨,置于1.5 mL离心管(约100 mg),加入1 mL TRIzol试剂,涡旋振荡后冰上静置5 min,加入200 μL 的氯仿,充分颠倒混匀30 s,室温下静置5 min,4℃下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min。小心吸取上层水相,置于新的1.5 mL的离心管中,加入0.6~0.8倍体积异丙醇,轻轻颠倒混匀后室温静置10 min,4℃下 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。弃上清液,加入1 mL 75%乙醇洗涤沉淀

(乙醇需提前预冷), 4°C 下 $8\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min. 弃上清液, 重复 2 次; 沉淀于超净工作台吹干, 加 $30\text{ }\mu\text{L}$ RNase-free H_2O 溶解, 备用。

cDNA 的合成(PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa): 添加 RNA $5\text{ }\mu\text{L}$, dNTPMix ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, CMV-CP R ($100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, RNase Free H_2O $3\text{ }\mu\text{L}$, 65°C 5 min, 立即放置冰上静置 2 min; 添加 $5\times$ Primescript II buffer $4\text{ }\mu\text{L}$, RNase Inhibitor $0.5\text{ }\mu\text{L}$, Primescript II RNase $1\text{ }\mu\text{L}$, RNase-Free H_2O $4.5\text{ }\mu\text{L}$, 混匀后 30°C 静置 10 min, $42\sim 50^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。

PCR 扩增: 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增合成 DNA. 反应总体积为 $50\text{ }\mu\text{L}$: 添加 $5\times$ Buffer $10\text{ }\mu\text{L}$, dNTPMix ($2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, CMV-CP F ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, CMV-CP R ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, rTaq 酶 $1\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $3\text{ }\mu\text{L}$, 加 ddH₂O 补足到 $50\text{ }\mu\text{L}$. 反应条件: 94°C 预变性 5 min 后, 94°C 30 s、 55°C 30 s、 72°C 1 min, 25 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

1.4 序列克隆、测定与分析

PCR 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测及回收 (Axygen DNA 凝胶回收试剂盒)。把回收的目的片段克隆到 pMD18-T vector (TaKaRa) 上, 并转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 进行菌落 PCR 鉴定, 筛选阳性克隆, 测序 (昆明擎科生物技术有限公司)。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接, 然后用 NCBI 进行序列比对, 并在 GenBank 对所得的序列进行提交 (序列登录号 MH807716)。根据地理位置及寄主下载部分典型序列进行并构建系统进化树, 进化树来自 15 个不同的分离物 (表 1)。

2 结果与分析

2.1 症状观察与病毒的形态特征

感病露兜树叶片表现为黄化斑点、花叶、褪绿等症状 (图 1)。取感病叶片汁液经机械接种本氏烟。用电镜负染色方法检测露兜树和本氏烟感病叶片汁液 (图 2), 经电镜观察, 发现在露兜树和本

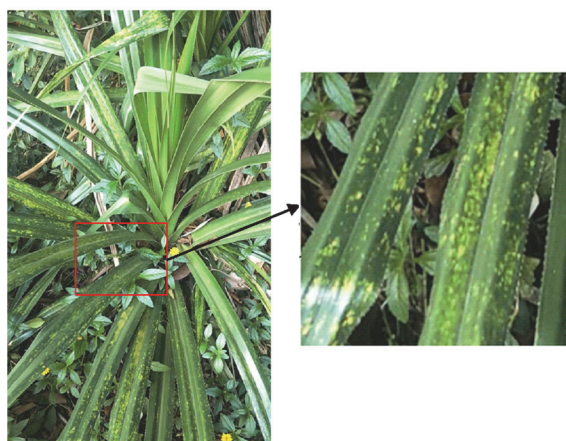


图 1 感病露兜树叶片症状
Fig. 1 Diseased *Pandanus* leaves symptoms

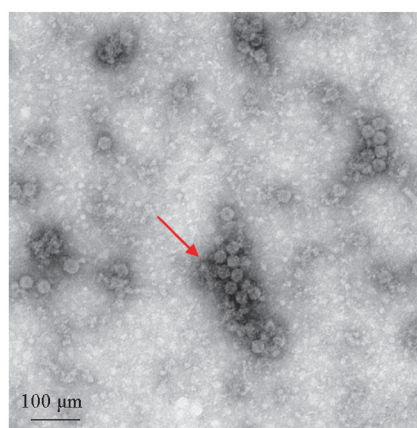


图 2 电镜下观察到本氏烟叶片中的病毒粒子 (箭头所指)
Fig. 2 Virus particles (arrow) in *N. benthamiana* leaves were observed under electron microscope

氏烟中均发现等轴对称二十面体的病毒粒子，直径约为 30 nm（洪健 等，2001），并未发现其他形态的病毒粒子，依据电镜及感病症状观察（图 2）推测其可能感染 CMV。

2.2 RT-PCR 检测结果、序列分析、系统进化树

以提取露兜树叶片总 RNA 为模板合成第一链 cDNA，用引物 CMV-CPF、CMV-CPR 进行 PCR 扩增，纯化目的片段、克隆、测序、序列分析，有 7 株样品获得了大小为 657 bp 的 DNA 片段（图 3），所获得的序列在 GenBank 的序列号为 MH807716。

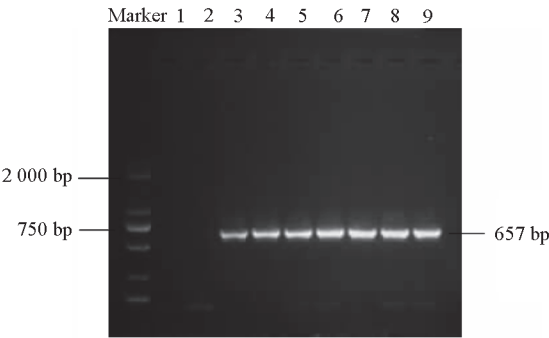


图 3 露兜树样品 CMV-CP 片段 RT-PCR 结果

M: DL2000 DNA marker; 1: 空白对照; 2: 阴性对照; 3 ~ 9: 显症露兜树样品。

Fig. 3 Results of CMV-CP fragment RT-PCR of *Pandanus tectorius* sample

M: DL2000 DNA marker; 1: Blank control; 2: Negative control; 3 – 9: Symptomatic of *Pandanus tectorius* sample.

经 NCBI 网站 BLAST 程序序列对比，结果（表 1）显示该序列与 CMV 泰国的黄瓜分离物 A27（FN552545）和 A168（FN552542）、四川烟草分离物 XD4（KJ746015）、印度香蕉的分离物 UP（AM158321）、苏丹辣椒分离物（KU976467）相似性为 98%，与印度茄子、黑胡椒中的分离物 Kanpur（GU906293、AY545924）、越南烟草分离物 VN-Tayninh（HE999621）、马来西亚黄瓜分离物 CLW2（JN054635）、埃及番茄分离物 HM3（KX014666）、孟加拉国茄子分离物（KM516903）相似性为 97%（Chen et al., 2007; Kumar et al., 2014; Bald-Blume et al., 2017）。这些分离物均属于亚组 I

表 1 露兜树分离的 CMV-CP 和其他分离株的黄瓜花叶病毒属病毒 CP 基因之间的序列相似性

Table 1 Sequence similarity between the CMV-CP isolated from <i>Pandanus</i> and the <i>Cucumovirus</i> CP genes of other isolates				
登录号 Accession No.	分离物 Isolate	寄主 Host	地区 Location	相似性/% Identity
FN552545	A27	黄瓜 <i>Cucumis sativas</i>	泰国 Thailand, Chiang Mai	98%
FN552542	A168	黄瓜 <i>Cucumis sativas</i>	泰国 Thailand, Lampang	98%
KJ746015	XD4	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	中国四川 China, Sichuan	98%
AJ242585	YN-B	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	中国云南 China, Yunnan	76%
AM158321	UP	香蕉 <i>Musa nana</i> Lour.	印度 India, Uttar Pradesh	98%
GU906293	Kanpur	茄子 <i>Solanum melongena</i>	印度 India, Kanpur, U.P.	97%
AY545924	---	黑胡椒 <i>Piper nigrum</i>	印度 India, Belur Karnataka	97%
AJ550020	---	菊花 <i>Chrysanthemum</i> sp.	印度 India, North Himalayan Region	53%
KU976467	PV-0857	辣椒 <i>Capsicum</i> sp.	苏丹 Sudan	98%
HE999621	VN-Tayninh	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	越南 Viet Nam, Tien Giang	97%
JN054635	CLW2	黄瓜 <i>Cucumis sativas</i>	马来西亚 Malaysia	97%
KX014666	HM3	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	埃及 Egypt	97%
KM516903	---	茄子 <i>Solanum melongena</i>	孟加拉国 Bangladesh, Barisal	97%
KC414925	101-8	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	塞尔维亚 Serbia	76%
FM992672	Tev	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	匈牙利 Hungary, Tevel	53%

(图 4), 与属于 CMV 亚组 II 的云南烟草分离物 YN-B (AJ242585) 和塞尔维亚的番茄分离物 101-8 (KC414925) 相似性为 76%, 与匈牙利刺槐上分离的花生矮化病毒 (*Peanut stunt virus*, PSV) 的 CP 基因 (FM992672) 和印度菊花上分离出的番茄不孕病毒 (*Tomato aspermy virus*, TAV) 的 CP 基因 (AJ550020) 的相似性为 53%。

用 MEGA 6.0 对 CMV 露兜树分离物 (MH807716) 与其他 15 个 CMV 分离物的外壳蛋白基因序列以及黄瓜花叶病毒属的另外两种病毒的 CP 基因构建了系统进化树, 露兜树分离物与 CMV 亚组 I 聚集在一簇 (图 4)。研究结果表明, 云南元江露兜树黄化斑点、花叶、褪绿的原因是感染了黄瓜花叶病毒。

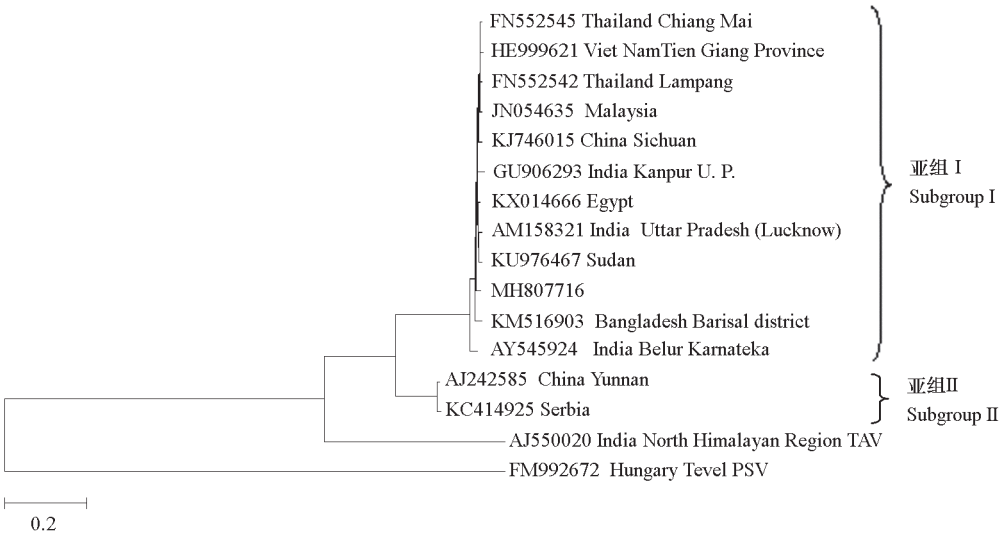


图 4 黄瓜花叶病毒露兜树分离物 CP 基因 (MH807716) 与其他分离物的 CP 基因的进化树分析
PSV 和 TAV 为进化树的根。

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of CP gene of CMV *Pandanus* isolate and other ones
PSV and TAV is used as the root.

3 讨论

有关露兜树病害的研究较少, 仅见内生菌引起的茎腐病报道 (肖荣凤 等, 2009)。本研究中应用透射电子显微镜负染色法在感病样品中观察到等轴对称二十面体, 直径约 30 nm 的病毒粒子, 没有观察到其他形态的病毒粒子, 初步推测可能是感染了 CMV; 设计 CMV 外壳蛋白基因的特异性引物, 用 RT-PCR 扩增、序列分析发现, 该病毒分离物属于 CMV, 与亚组 I 的 CMV 分离物有 97%~98% 的序列相似性, 与亚组 II 的 CMV 分离物相似性为 76%, 与黄瓜花叶病毒属病毒的 PSV-CP 和 TAV-CP 的相似性均为 53%, 用该引物对检测了症状明显的露兜树叶片样品, 均扩增到了目的片段。这些结果证明, 从引起露兜树黄化斑、花叶病的样品中检测到 CMV, 说明 CMV 可能是引起露兜树黄化斑、花叶病的病原。后续需将分离纯化的病毒人工回接露兜树以进一步证实露兜树为 CMV 的新寄主。这是第一次有关露兜树病毒病方面的报道, 也是 CMV 侵染露兜树的首次报道。CMV 是一种世界性分布的病毒, 影响范围非常广, 病毒的防控和抗病育种是研究的重点。而露兜树作为 CMV 可能的新寄主, 对该病毒的研究以及对露兜树病毒病害的防控有一定的作用。

References

- Bald-Blume N, Bergervoet J H W, Maiss E. 2017. Development of a molecular assay for the detection of *Cucumber mosaic virus*, and the discrimination of its subgroups I and II. *Journal of Virological Methods*, 243: 35 – 43.
- Chen Y, Chen J, Zhang H, Tang X, Du Z. 2007. Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. *Virus Genes*, 35 (2): 405 – 413.
- Fang Qi, Ding Ming, Dong Jia-hong, Yin Yue-yan, Zhang Lei, Su Xiao-xia, Li Ting-ting, Zhang Li-zhen, Peng Lu-bo, Zhang Zhong-kai. 2013. Preliminary report of tospovirus infecting macadamia seedling in Yunnan, China. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (2): 350 – 354. (in Chinese)
- 方 琦, 丁 铭, 董家红, 尹跃艳, 张 磊, 苏晓霞, 李婷婷, 张丽珍, 彭璐波, 张仲凯. 2013. 云南澳洲坚果苗木感染番茄斑萎病毒属病毒初报. *园艺学报*, 40 (2): 350 – 354.
- Hong Jian, Li De-bao, Zhou Xue-ping. 2001. Plant virus classification map. Beijing: Science Press: 147 – 149. (in Chinese)
- 洪 健, 李德葆, 周雪平. 2001. 植物病毒分类图谱. 北京: 科学出版社: 147 – 149.
- Kumar S, Gautam K K, Raj S K. 2014. Molecular identification of *Cucumber mosaic virus*, isolates of subgroup IB associated with mosaic disease of eggplant in India. *Virus Disease*, 25 (1): 129 – 131.
- Xiao Rong-feng, Liu Bo, Lin Kang-mei, Zheng Xue-fang, Lan Jiang-lin. 2009. Identification and distribution inside plant of pathogen causing stem rot of *Pandanus veitchii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (2): 251 – 256. (in Chinese)
- 肖荣凤, 刘 波, 林抗美, 郑雪芳, 蓝江林. 2009. 斑叶露兜树茎腐病原鉴定及植株体内菌量测定. *园艺学报*, 36 (2): 251 – 256.
- Zhang X, Guo P, Sun G, Chen S, Yang M, Fu N, Wu H, Xu X. 2012. Phenolic compounds and flavonoids from the fruits of *Pandanus tectorius* soland. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6 (13): 2622 – 2626.