

百合三种病毒的多重 RT - PCR检测

徐榕雪^{1,2}, 明 军^{1*}, 穆 鼎¹, 刘 春¹, 汤庚国², 王晓武¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

摘 要: 根据基因库中黄瓜花叶病毒 (*Cucum berm osaic virus*, CMV)、百合斑驳病毒 (*Lily m ottle virus*, LMoV)、百合无症状病毒 (*Lily sym ptom less virus*, LSV) 的外壳蛋白基因序列, 设计了 3 对特异引物, 通过对扩增条件进行优化, 建立了同时检测 CMV、LMoV 和 LSV 的多重 RT - PCR 检测方法。该方法可以从带有 CMV、LMoV 和 LSV 的样品中同时扩增出 3 条大小与试验设计相符的 657 bp (CMV)、428 bp (LMoV)、171 bp (LSV) 的特异性多重 RT - PCR 扩增带。扩增产物测序表明, CMV、LMoV 和 LSV 三种病毒与 GenBank 中登录的亚洲和荷兰多数分离物核苷酸同源性在 90% 以上, 地域差异不明显, 外壳蛋白序列高度保守。

关键词: 百合; 多重 RT - PCR; 病毒检测; 黄瓜花叶病毒; 百合斑驳病毒; 百合无症状病毒

中图分类号: S 682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0443-06

Detection of Three Lily Viruses by Multiplex RT - PCR

XU Rong-xue^{1,2}, M NG Jun^{1*}, MU Ding¹, L U Chun¹, TANG Geng-guo², and WANG Xiao-wu¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Nanjing Agricultural University, College of Forest Resources and Environment, Nanjing 210037, China)

Abstract: A multiplex RT - PCR method was developed to simultaneously detect three viruses of Lily by using 3 sets of specific primers designed according to CMV (*Cucum berm osaic virus*), LMoV (*Lily m ottle virus*) and LSV (*Lily sym ptom less virus*). All samples infected by CMV, LMoV and LSV could be amplified by multiplex PCR, and yielding three special bands of CMV (657 bp), LMoV (428 bp) and LSV (171 bp). Sequence identities of the three amplified virus fragments correlated well with other isolates from Asia and the Netherlands registered in the GenBank. Remarkably high homology in the coat protein sequences of the three viruses has been observed respectively despite their different origins

Key words: Lily; Multiplex RT - PCR; Virus detection; *Cucum berm osaic virus*; *Lily m ottle virus*; *Lily sym ptom less virus*

我国栽培百合普遍受到病毒侵染, 病原和田间症状均相当复杂。其中, 黄瓜花叶病毒 (*Cucum berm osaic virus*, CMV)、百合斑驳病毒 (*Lily m ottle virus*, LMoV) 和百合无症状病毒 (*Lily sym ptom less virus*, LSV) 是目前严重危害百合的三种主要病毒 (Asjes, 2000; 刘文洪 等, 2004)。CMV 和 LMoV 单独侵染时分别表现为花叶、花瓣斑驳, LSV 一般无症状。但是, 它们常复合侵染后表现为幼叶向下反卷扭曲、系统花叶、坏死斑、花扭曲或畸形呈舌状、花瓣斑驳、花期缩短、植株矮化呈丛簇状, 甚至无花、植株无主秆等症状, 造成百合切花与鳞茎品质和产量的严重下降 (Chang & Chen, 1998; Bellardi et al, 2002)。

感病植株终生带毒, 可通过蚜虫或汁液传播给下一代籽球或其他百合种群。由于百合种球生产主

收稿日期: 2006 - 07 - 10; 修回日期: 2007 - 03 - 14

基金项目: 国家社会公益研究项目 (2005DB022); 国家科技支撑项目 (2006BAD01A18); 北京市花卉重点项目 (YL-HH2006001, YLHH2006002)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mingjunmail@yahoo.com.cn)

要靠扦插和分球等无性繁殖方式，一旦染毒，在开放环境中病毒便会在体内积累并扩散，最终造成危害。

目前，常用的百合病毒检测方法有生物学方法、电子显微镜法、血清学方法、分子杂交、反转录聚合酶链式反应（Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）以及基因芯片等。其中，RT-PCR方法已被证实是目前特异性最强、灵敏度最高的病原检测方法，现已广泛应用于病毒诊断和检测（Nie et al, 2001）。在此基础上开发的多重 RT-PCR（Multiplex RT-PCR）可以一次检测出多达 6 种植物病毒（Bertolini et al, 2001），在复合侵染诊断中，不仅可以大大提高检测效率，又可以显著降低试验成本，因此具有很高的实际应用价值。目前，未见国内外有应用多重 RT-PCR 同时检测 CMV、LMoV 和 LSV 三种百合主要病毒报道。

本研究利用多重 RT-PCR 的方法，建立了稳定的同时鉴别 CMV、LMoV 和 LSV 三种病毒的检测体系，并应用该体系检测了部分百合脱毒试管苗。

1 材料与方法

1.1 材料

CMV、LMoV、LSV 三种病毒复合侵染病毒症状的样品 *Lily longiflorum* ‘Snow Queen’ 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所收集和保存。

采集感病植株不同部位——花被片、上部嫩叶、下部老叶、内侧鳞茎、外侧鳞茎并分别提取总 RNA，进行多重 RT-PCR 体系的建立和优化。应用多重 RT-PCR 检测的经不同脱毒处理的百合组培苗材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所收集、鉴定和保存的东方百合杂种系‘索蚌’（Oriental hybrids ‘Sorbonne’）品种。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用北京百泰克公司 TRIPURERNA 提取试剂盒提取总 RNA。取 0.1 g 植物组织在液氮中研磨，将匀浆液转入盛有 1 mL Tripure 提取液的离心管中（样品体积不超过 Tripure 体积的 10%），振荡混匀，室温静置 5 min，加入 200 μ L 氯仿，12 000 r/min 离心 15 min，取上层水相 0.5 mL 移至 1.5 mL 离心管中，加入 500 μ L 异丙醇，混匀，静置 10 min，而后 12 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 75% 乙醇 1 mL 洗涤，7 500 r/min 离心 10 min，弃上清使 RNA 沉淀恰好干燥。加入 20 μ L 无菌水溶解 RNA，-70 保存或进行 RT-PCR 扩增。

1.2.2 引物设计与合成 根据 NCBI GenBank（The National Center for Biotechnology Information, 美国）收录的 CMV、LMoV、LSV CP 基因序列应用 Primer Premier 5.0 设计软件分别设计这三种病毒的特异引物 CMV₁/CMV₂、LMoV₁/LMoV₂、LSV₁/LSV₂，序列见表 1。

表 1 LSV、CMV 和 LMoV 引物序列

Table 1 Primer sequences, size and RT-PCR product size

| 病毒 Viruses | 上游引物 Upstream primer(5' - 3') | 下游引物 Downstream primer(5' - 3') | 产物大小 Product size (bp) |
|---------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| CMV | ATGGACAAATCTGAA TCAACCA G | TCA GACTGGGAGCACTCCA G | 657 |
| LMoV | CACCTCACCAAA TGTAAG TGG | TAGAAATTCCAA GTAAAGGAGTGC | 428 |
| LSV | GAGGAAGCAGCTGGACTG | CGCCTGA TGA TCCCTC | 171 |

1.2.3 RT-PCR 体系建立与优化 对多重 PCR 的各引物浓度、dNTPs 及 PCR 反应的变性、退火至延伸条件以及循环次数等进行优化，确定最佳的反应模式为：反转录 42 2 h，90 5 min。PCR 反应体系为 20 μ L，包括：Taq PCR buffer（百泰克，内含 1.5 mmol/L MgCl₂），200 μ mol/L dNTPs Mix-

tures, CMV、LMoV和 LSV 上下游引物各 5 pmol, 5 μ L dDNA, 1 U *Taq* 酶。经优化的 PCR 程序: 95 预变性 4 min, 进入 94 变性 20 s, 52 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 30个循环, 再 72 延伸 5 min, 最后于 4 结束反应。

在 MJ-200 PCR 扩增仪上进行扩增, 进行琼脂糖 (1.0%) 凝胶电泳, 利用 Gel Doc1000 凝胶分析仪 (Bio-Rad) 观测电泳结果, 并照相记录。

1.2.4 PCR 产物的回收、验证和测序 RT-PCR 扩增产物经回收纯化后, 用 pDM18-T vector 载体连接转化大肠杆菌 DH 5 感受态细胞, LB 培养基上 37 培养 16 h 挑取白色菌落, 碱裂解法提取质粒 DNA, 利用 PCR 技术进行筛选阳性克隆。

DNA 测序由中国农业科学院重大工程实验室完成。采用 DNA Star 的 Megalign 程序和聚类法 (Clustal method) 将三种病毒扩增片段测序结果与 GenBank 数据库中已登录的其它分离物的核苷酸序列进行同源性比较。

1.2.5 应用多重 RT-PCR 检测百合脱毒苗 应用本体系方法抽样检测 5 株经不同脱毒处理的东方百合杂种系 ‘索蚌’ 品种 (Oriental hybrids ‘Sorbonne’) 的脱毒苗, 并用单重 RT-PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 的特异性

单重、二重和三重 PCR 分别从带有 CMV、LMoV 和 LSV 病毒的百合叶片组织中扩增出单一、两条或三条特异的目标谱带, 大小分别约为 657 bp、430 bp、171 bp; 健康叶片则无扩增谱带, 均未出现非特异扩增产物 (图 1)。结果显示: 多重 PCR 具有较高的特异性, 可以同时、准确检测到百合叶片中复合感染的 CMV、LSV、LMoV。且各片段长度具有明显的差异, 容易区分。

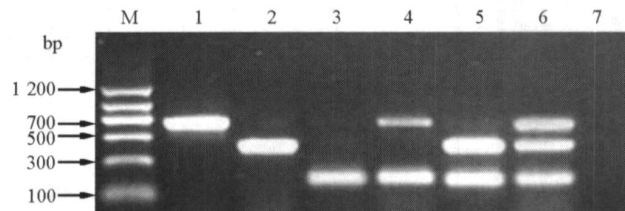


图 1 多重 RT-PCR 特异性试验

Fig. 1 Specificity of multiplex RT-PCR

M: DNA marker; 1: CMV; 2: LMoV; 3: LSV; 4: CMV + LSV;

5: LMoV + LSV; 6: CMV + LMoV + LSV; 7: Healthy leaf

2.2 多重 RT-PCR 体系对不同取样部位的病毒检测

用同一感病植株的花、叶、鳞片提取浓度相同 RNA 进行反转录 (图 2), 分别进行多重 RT-PCR, 结果均得到了清晰的扩增谱带 (图 3)。结果表明: 三种病毒在百合花、叶、鳞片上均有分布, 且 LSV、LMoV 的不同取样部位的特异扩增条带的强度比较一致, 而 CMV 在上部叶片中扩增较强, 在内侧鳞茎最弱, 得到单重 RT-PCR 验证 (图 4)。

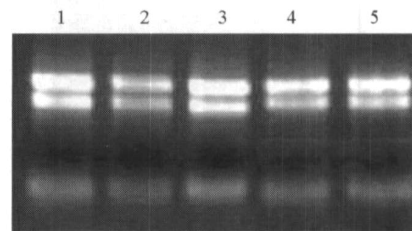


图 2 不同部位 RNA 提取结果

1: 外鳞茎; 2: 内鳞茎; 3: 花; 4: 上部叶; 5: 下部叶。

Fig. 2 RNA extracted from different parts of the plant

1: Outside bulb; 2: Inside bulb; 3: Flower;

4: Upside leaf; 5: Underside leaf

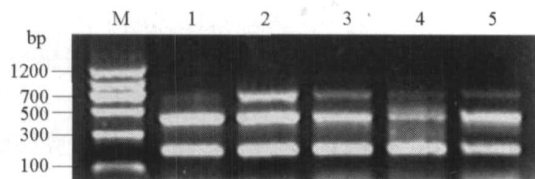


图3 不同取样部位多重 RT-PCR 扩增图

M: DNA marker; 1: 花; 2: 上部叶; 3: 下部叶;
4: 内侧鳞茎; 5: 外侧鳞茎。

Fig. 3 The specificity of multiplex RT-PCR using samples from different parts of plant

M: DNA marker; 1: Flower; 2: Upside leaf;
3: Underside leaf; 4: Inside bulb; 5: Outside bulb.

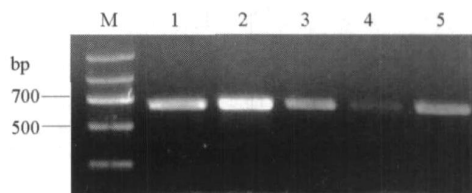


图4 单重 RT-PCR 验证不同部位 CMV 病毒含量

M: DNA maker; 1: 花; 2: 上部叶; 3: 下部叶;
4: 内侧鳞茎; 5: 外侧鳞茎。

Fig. 4 Identification of CMV in different parts of the plant by single RT-PCR

M: DNA marker; 1: Flower; 2: Upside leaf;
3: Underside leaf; 4: Inside bulb; 5: Outside bulb.

2.3 多重 RT-PCR产物克隆测序结果

回收纯化的 CMV、LMOV 和 LSV 扩增片段所测得的序列全长分别为 657 bp、428 bp、171 bp 与单重 PCR 扩增得到的比对序列一致。本试验所得到的 CMV 扩增序列与亚洲地区日本、韩国、印度的分离物同源性均在 99% 以上，与荷兰分离物同源性高达 99.7% (图 5)。

LMOV 扩增序列与其它分离物同源性也很高，与日本分离物同源性达 98.8%，与中国浙江和云南两省分离物同源性都在 92% 以上 (图 6)；LSV 扩增片段序列同源性分析表明：该扩增片段与中国分离物同源性较高，与韩国和印度分离物同源性也在 96% 以上 (图 7)。证明该 3 种病毒的外壳蛋白是高度保守的，根据其 CP 序列设计的引物也具有广泛的适用性。

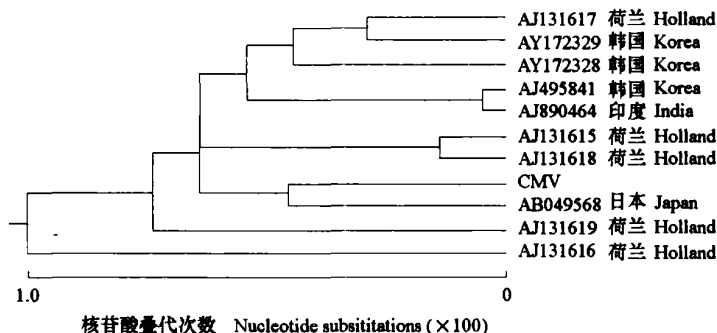


图5 CMV 扩增片段与其它分离物核苷酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic dendrogram of the CMV nucleotide sequences

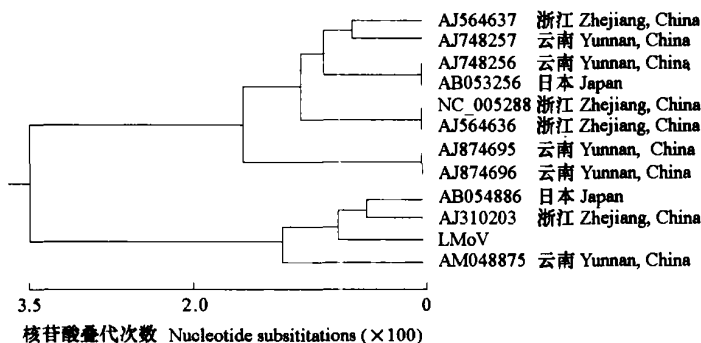


图6 LMOV 扩增片段与其它分离物核苷酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic dendrogram of LMOV specific amplified on the nucleotide sequences by multiplex RT-PCR with others

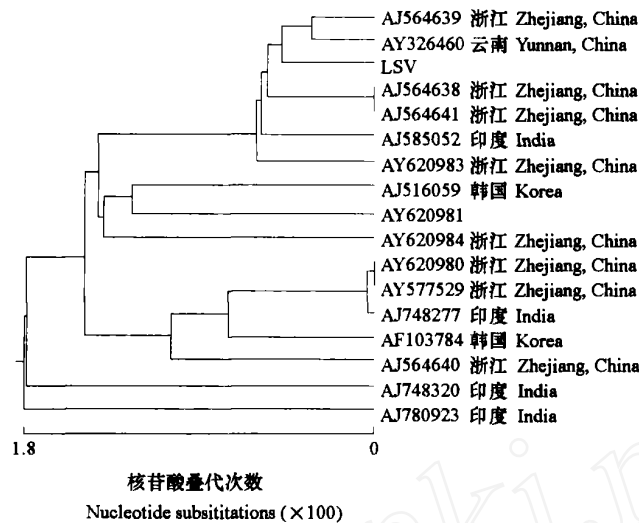


图 7 LSV 扩增片段与其它分离物核苷酸序列的系统进化树

Fig 7 Phylogenetic dendrogram of LSV specific amplified on the nucleotide sequences by multiplex RT - PCR with other isolates

2.4 多重 PCR 检测组培苗

应用该方法随机抽样检测经不同脱毒处理的东方百合‘索蚌’品种组培苗 5 株，结果检测出分别含有未脱除的 CMV 和 LMoV 的两株（图 8 中 1, 3）。利用单重 RT - PCR 验证，结果相符。证明该方法具有较高的灵敏度和准确性，可以用于大量脱毒苗的检测。

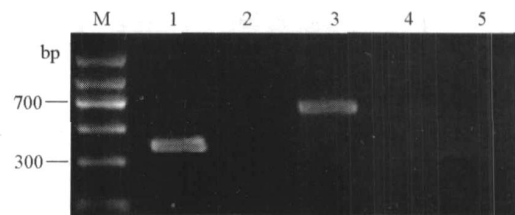


图 8 东方百合系‘索蚌’组培苗检测

Fig 8 Detection of 3 viruses in vitro plants of Oriental hybrids Sobonne

3 讨论

目前已报道的百合的病毒有 19 种（Lee et al, 1992; 明军等, 2006），其中 CMV、LMoV 和 LSV 三种病毒危害较为普遍和严重。

王继华等（2005）应用二重 RT - PCR 的方法检测了 LSV 和 LMoV，可从稀释 10^4 （相当于 200 ng）的粗提液中得到扩增产物。但由于实际生产中，百合多表现三种病毒的复合侵染，二重 PCR 不能满足需要。

王进忠等（2005）对百合病毒核酸进行不对称 RT - PCR 扩增，通过荧光标记制作的基因芯片可以检测到 CMV、LSV 和 LMoV。与之相比，多重 RT - PCR 明显简便、快捷。另外本试验所设计的引物 T_m 值接近，从而实现了同一退火温度的扩增，不需要带有 Touchdown 程序的 PCR 仪，具有更高的实用性和可靠性。

病毒在感病植株体内各组织器官具有不均匀分布特性（White, 1934）。因此，检测的部位差异可能造成检测结论的偏差。本试验分别从百合的不同部位——花、叶片和鳞茎中检测到了三种病毒，这也是由鳞茎提取 RNA 运用 RT - PCR 方法进行病毒检测的首次报道，对于以种球作为主要流通方式的百合具有重要意义。另外，在所提取的植物 RNA 含量基本相同的条件下，可以明显地观察到扩增谱带亮度的差别，通过单重 PCR 验证结果一致，可能预示 CMV 的表达与植株的代谢强度有关。

通过三种病毒的测序结果与其它分离物序列的比对可知：三种病毒与其它大部分分离物的同源性

均在 90%以上, 这可能与目前百合种球在世界流通广, 各地栽培的百合球茎来源复杂, 地域分布特点不明显有关 (Chen et al, 2001)。同时也证明了外壳蛋白 (CP) 在病毒的传播和保护病毒 RNA 方面起重要作用且相对保守 (李燕等, 2005), 根据外壳蛋白序列所设计的三对引物建立的多重 RT-PCR 体系能够检测侵染百合的不同来源的 CMV、LMOV 和 LSV。同时也为今后利用该方法检测更多种病毒提供了依据。

References

- Asjes C J. 2000. Control of aphid-borne lily symptomless virus and lily mottle virus in *Lilium* in the Netherlands. *Virus Res*, 71 (1-2): 23 - 32.
- Bellardi M G, Nanni G, Bertaccini A. 2002. Old and new viruses of lily in Italy. *Acta Horticulturae*, 568: 215 - 220.
- Bertolini E, Olmos A, Martinez M C, Gorris M T, Cambra M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Viral Methods*, 96 (1): 33 - 41.
- Chang C, Chen C. 1998. Current status of lily virus research and the development of its detection techniques in Taiwan. Taiwan: Special Publication Taichung District Agricultural Improvement Station.
- Chen Y K, Derks A F, Langeveld S. 2001. High sequence conservation among cucumber mosaic virus isolates from lily. *Arch. Virol*, 146: 1631 - 1636.
- Lee K H. 1992. Disease incidence, symptomatology and identification of two new isometric viruses from imported lilies [M. S. thesis], Chunnam University.
- Li Yan, Li Fa-hui, Chen Yu-quan. 2005. The expression of lily symptomless carlavirus CP gene in *Escherichia coli*. *Acta Agriculturae Boreali-acidentalis Sinica*, 14 (4): 171 - 173. (in Chinese)
- 李 燕, 李发慧, 陈毓荃. 2005. 百合无症病毒 CP 基因在大肠杆菌中的表达. *西北农业学报*, 14 (4): 171 - 173.
- Liu Wen-hong, Hong Jian, Chen Ji-shuang, Ye Mei-qin. 2004. Detection and diagnosis of viruses infecting lily. *Journal of Chinese Electron*, 23 (3): 225 - 228. (in Chinese)
- 刘文洪, 洪 健, 陈集双, 叶美琴. 2004. 百合病毒病原的检测进展. *电子显微学报*, 23 (3): 225 - 228.
- Ming Jun, Xu Rong-xue, Mu Ding, Liu Chun. 2006. Developments in technique for lilies virus elimination. In: Zhang Qi-xiang ed. *Advances in ornamental horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House: 504 - 511. (in Chinese)
- 明 军, 徐榕雪, 穆 鼎, 刘 春. 2006. 百合病毒及其脱除研究进展. 见: 张启翔编. *中国观赏园艺研究进展*. 北京: 中国林业出版社: 504 - 511.
- Nie X, Singh R P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods*, 91: 37 - 49.
- Wang Ji-hua, Wang Li-hua, Ding Yuan-ming, Qu Su-ping, Xiong Li, Tang Kai-xue. 2005. Detection of *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* by multiplex RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*, (2): 100 - 103. (in Chinese)
- 王继华, 王丽花, 丁元明, 瞿素萍, 熊 丽, 唐开学. 2005. 应用多重 RT-PCR 检测百合无症病毒和百合斑驳病毒. *园艺学报*, (2): 100 - 103.
- Wang Jin-zhong, Jia Hui, Wen Si-yuan, Wang Sheng-qi. 2005. Detection for CMV, LSV, LMOV infected lily with DNA microarray techniques. *Virologica Sinica*, (20): 429 - 433. (in Chinese)
- 王进忠, 贾 慧, 文思远, 王升启. 2005. 百合病毒的 DNA 芯片检测技术研究. *中国病毒学*, 20: 429 - 433.
- White P. 1934. Multiplication of virus of tobacco and aucuba mosaic on growing exsised tomato roots. *Phytopathology*, 24: 1003 - 1011.