

菊花矮化类病毒的分子检测与序列分析

张志想¹, 葛蓓亭^{1,2}, 潘嵩¹, 赵哲^{1,2}, 王红清², 李世访^{1,*}

(¹中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; ²中国农业大学农学与生物技术学院果树系, 北京 100193)

摘要: 菊花矮化病由菊花矮化类病毒 (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) 引起。从北京、海南万宁、合肥和哈尔滨共采集了 122 个野生及商业种植的菊花样品, 使用改进的 CTAB 法提取菊花总 RNA 后, 通过斑点杂交检测 CSVd, 应用 RT-PCR 对阳性样品进行克隆、测序。斑点杂交结果表明, 在检测的 122 个样品中有 14 个样品感染了 CSVd, 感染率为 11.5%; 除哈尔滨外的其余 3 个地区均有 CSVd 的发生。序列比较分析结果表明, 中国的 CSVd 分离物与韩国和日本分离物的序列最为接近, 对其二级结构进行分析发现, 与 CSVd 的参考序列 (NC002015) 相比, 所获得的中国 CSVd 分离物的序列中虽然有 21 个碱基发生了突变 (大多位于二级结构上的致病区内), 但并未影响其折叠成稳定的拟棒状结构。

关键词: 菊花; 菊花矮化类病毒; 斑点杂交; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 12-2349-08

Molecular Detection and Sequences Analysis of *Chrysanthemum stunt viroid*

ZHANG Zhi-xiang¹, GE Bei-bei^{1,2}, PAN Song¹, ZHAO Zhe^{1,2}, WANG Hong-qing², and LI Shi-fang^{1,*}

(¹State Key Laboratory of Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ²Department of Fruit Science, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The chrysanthemum stunt disease, caused by *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), is a serious threat to chrysanthemum production. To survey the occurrence and epidemic of CSVd and analyze the molecular characterization of CSVd isolates of China. In total of 122 samples, including both wild and commercial cultivars, were collected from Beijing, Wanning in Hainan, Harbin and Hefei in China. The total RNA of chrysanthemum samples were extracted by modified CTAB method and then detected by dot-blot hybridization using cRNA probe of CSVd. The positive samples tested by dot-blot hybridization were further detected by RT-PCR. cDNA of CSVd was cloned and sequenced. The results of dot-blot hybridization showed that 14 samples were positive for CSVd, which occurred in all the regions except for Harbin at infection ratio of 11.5%. Sequences analysis indicated that CSVd isolates of China shared the most close relationship with CSVd isolates of Korea and Japan. Compared with reference sequence of CSVd (NC002015), there were 21 mutations for CSVd isolates of China. The prediction of secondary

收稿日期: 2011 - 08 - 18; **修回日期:** 2011 - 11 - 29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970134, 30811140157, 30771403)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sfl@ippcaas.cn)

致谢: 本研究中的大部分菊花样品由中国农业大学农学与生物技术学院园林植物与观赏园艺系洪波老师提供。洪波老师还为文章的写作提出了宝贵建议, 在此谨致谢意!

structure showed the mutations, most of which happened in pathogenicity region, have no impact on folding into stable rod-like structure.

Key words: chrysanthemum; *Chrysanthemum stunt viroid*; dot-blot hybridization; RT-PCR; sequence analysis

菊花矮化类病毒 (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) 侵染菊花栽培品种, 引起植株矮化, 花色改变等 (Diener & Lawson, 1973; Hadidi et al., 2003), 且会扰乱开花的光周期 (Hosokawa et al., 2004), 严重影响菊花的观赏和经济价值。CSVd 感染植株后, 潜伏期长, 且易传播。早期对繁殖材料进行快速、灵敏的诊断是控制病害蔓延的重要手段。正反向电泳 (Mosch et al., 1978; 陈炜 等, 1981; 李世访 等, 2002), 斑点杂交 (Candresse et al., 1988, 1990), 组织印记杂交 (Hooftman et al., 1996), RT-PCR (Nakahara et al., 1999) 及 Real-time PCR (Mumford et al., 2000) 等技术被广泛应用于 CSVd 的检测。

CSVd 广泛分布于世界各国的菊花种植区 (Hadidi et al., 2003)。近年来韩国和日本均有菊花矮化病害流行的报道 (Chung & Pak, 2008; Matsushita & Penmetcha, 2009)。中国于 20 世纪八、九十年代报道了 CSVd 的发生 (陈炜 等, 1981; 朱水芳和舒秀珍, 1991)。2010 年, 作者在海南万宁菊花种植区监测到菊花矮化病害的流行。然而到目前为止, 对 CSVd 的引入途径和中国 CSVd 分离物的分子特征等问题仍缺少研究。本研究中使用斑点杂交和 RT-PCR 等技术调查中国不同地区 CSVd 的发生, 通过序列分析探明中国 CSVd 分离物的分子特征, 以期监测和防控菊花矮化病在中国的流行和发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 11 月从北京、海南万宁、合肥和哈尔滨 4 个地区采集 122 个菊花叶片样品 (表 1), 于 2010 年 12 月, 在中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室进行样品检测。

1.2 核酸提取

菊花样品的总 RNA 的提取参考文献 (Li et al., 2008) 中的 CTAB 法, 并略有改进: 提高了提取缓冲液中 NaCl 和 β -巯基乙醇的浓度, 并且将氯仿换为酚:氯仿 (1:1) 进行抽提。具体为: 加液氮研磨 0.1 g 幼嫩叶片, 将其转入 1.5 mL 离心管内, 加 1 mL 65 °C 提前预热的 CTAB 提取缓冲液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0; $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA; $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; 2% CTAB; 2% PVP; 使用前加 2% β -巯基乙醇)。65 °C 温育 15 min, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清液, 加等体积的酚:氯仿 (1:1), 振荡混匀后, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 重复 1 次。取上清液, 加 0.6 倍体积的异丙醇, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次。最后, 将沉淀溶于 30 μL 灭菌水中。吸取 3~5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并且测 OD 值, 检验核酸的质量。

1.3 引物设计与合成

对 GenBank 中已经登录的 CSVd 的序列进行比对, 然后根据参考序列 (NC002015) 在保守区内设计一对引物。反向引物: CSVd-207R (5'-AGAGGAAGGAACTAAAGGA-3', 与 188~201 位置处的序列互补; 正向引物: CSVd-208F (5'-CCTGGAGAGGTCTTCTG-3', 与 208~224 位置处的序列同源, 预期目的片段大小为 356 bp。引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.4 RT-PCR、克隆及测序

反转录: 20 μL 的 RT 反应体系中, 加入模板 2 μL , M-MLV 5 \times buffer 4 μL , 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 4 μL , 2 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ RNA 酶抑制剂 1 μL , 反向引物 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , M-MLV 反转录酶 (10 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , 加 ddH₂O 至 20 μL , 混匀。42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 冰浴 2 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR: 50 μL 反应体系中, 加入 2 \times Long Taq PCR Master Mix 25 μL , 正、反向引物 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , RT 产物 3 μL , 补 ddH₂O 至 50 μL , 混匀。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测、采集图片后, 用 Axygen 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 并将其连接至 pGEM-T (Promega) 载体上, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取克隆摇菌后, 用菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 最后送至华大基因有限公司进行序列测定。

1.5 斑点杂交

1.5.1 cRNA 探针制备

通过酶切, 将含有 CSVd 的全长 cDNA 片段的重组质粒 (pGEM-T/CSVd) 线性化。纯化后, 以 CSVd 序列同源的正链 cDNA 为模板, 使用 RNA 聚合酶 (T7 或者 SP6), 在地高辛标记的 UTP (dig-UTP) 存在的反应条件下, 体外转录出地高辛标记的 CSVd 的负链 RNA。反应体系 (20 μL) 为: 纯化的线性重组质粒 > 1 μg ; 5 \times 反转录缓冲液, 4 μL ; 5 \times NTPmix (含 dig-UTP) 4 μL ; RNA 酶抑制剂 2 μL ; RNA 聚合酶 (20 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 2 μL ; 补 ddH₂O 至 20 μL 。混匀后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h。反应结束后, 加入 2 μL DNase I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min, 消化模板。最后, 加入 2 μL 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 终止反应, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.2 斑点杂交

在使用斑点杂交进行田间菊花样品的检测前, 首先通过浓度梯度稀释来确定探针检测的灵敏度。各取 5 μg CSVd 阳性和阴性样品的总 RNA, 依次进行 5 \times 浓度梯度稀释, 通过杂交确定探针检测的灵敏度。进行田间菊花样品检测时, 取 1 μg 总 RNA, 加到尼龙膜上。待自然干燥后, 紫外交联固定 (1 200 \times 100 $\mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$)。加入杂交液 (Roche), 68 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交至少 1 h; 加探针 (20 ~ 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杂交液), 68 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。杂交结束后, 弃杂交液, 用 2 \times SSC、0.1% SDS 室温洗膜 2 次, 每次 5 min; 再用 0.1 \times SSC、0.1% SDS 68 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜 2 次, 每次 15 min; 接着用 1% 封闭液室温封闭 30 min; 加入 Anti-DIG-AP 抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h; 之后用检测液平衡 3 ~ 5 min; 最后, 往膜上加 CSPD 进行化学发光成像或胶片曝光。

1.6 序列测定与分析

将所测得的序列在 GenBank 中进行 BLAST 检索, 确认序列是否与 CSVd 同源。然后用 Clustalx 1.83 进行多序列比对分析。使用 Mfold (Zuker, 2003) 预测 CSVd RNA 的二级结构 (<http://mfold.rna.albany.edu/>), 然后用 RnaViz 2.0 进行编辑。

2 结果与分析

2.1 症状观察

田间调查发现, 有些菊花品种感染 CSVd 后并不表现明显症状, 有些则症状明显, 并且不同感病品种所表现的症状不同。CSVd 侵染能在一种未知菊花品种上引起明显的斑点症状 (图 1, B)。

感染 CSVd 的‘夏黄’菊花沿叶片主叶脉会出现褪绿黄化症状(图 1, C)。“黄金”菊花感染 CSVd 后,植株明显矮化(图 1, D);病株节间缩短;病叶变小,无褪绿或者斑点症状。



图 1 CSVd 在菊花上引起的症状

A: 健康菊花; B: 感染 CSVd 的未知品种菊花表现出的斑点症状; C: 菊花‘夏黄’感染后沿叶脉褪绿黄化;
D: 菊花‘黄金’感染后的植株矮化。

Fig. 1 The symptoms of CSVd infection in chrysanthemum

A: Healthy plant; B: Chrysanthemum of unknown cultivar infected by CSVd showed speckle symptoms; C: Diseased chrysanthemum of ‘Summer Yellow’ showed yellowing along leaf veins; D: CSVd infection caused chrysanthemum of ‘Golden’ showed dwarf symptoms.

2.2 核酸提取

使用改进的 CTAB 法提取样品总 RNA 后测定其 OD 值,结果显示所得 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 为 1.9~2.1, RNA 浓度均大于 $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。这表明改进的 CTAB 法适合于菊花样品的总 RNA 提取。

2.3 探针灵敏度测定

斑点杂交结果表明检测的极限点为 0.32 ng 总 RNA (图 2)。考虑到组织中 CSVd 的含量在不同季节、不同品种上可能存在的差别,为尽可能避免假阴性结果的产生,在实际检测中吸取不少于 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 用于 CSVd 的斑点杂交检测。

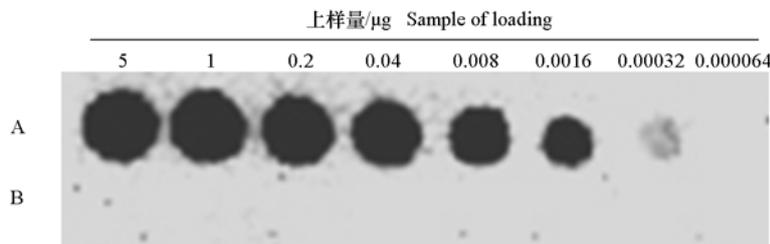


图 2 菊花样品的 CSVd 斑点杂交检测灵敏度测定

A: 感病菊花样品; B: 健康对照。

Fig. 2 The sensitivity analysis of dot-blot hybridization detection of CSVd

A: Chrysanthemum infected with CSVd; B: Health control.

2.4 田间菊花样品的检测

应用斑点杂交对采集的 122 个菊花样品进行检测,结果表明:‘黄金’、‘夏黄’、‘13 号’和采自合肥的一个未知品种中的共 14 个样品为 CSVd 阳性,感染率为 11.5%。其中,‘夏黄’和‘13 号’品种的各 5 个样品均被 CSVd 侵染,而‘黄金’和未知品种中各有 2 个样品感染了 CSVd (表 1)。

表 1 供试菊花样品及斑点杂交检测的感染率

Table 1 Chrysanthemum samples used for this study and infection ratio of CSVd detected by dot-blot hybridization

品种 Cultivar	地区 Region	阳性样品数/被测样品数 No. of positive samples/ No. of detected samples	品种 Cultivar	地区 Region	阳性样品数/被测样品数 No. of positive samples/ No. of detected samples
13 号 Thirteenth	北京 Beijing	5/5	绿牡丹 Green Peony Single	北京 Beijing	0/5
多头菊 Deliflame	北京 Beijing	0/5	风车紫 Pinwheel Purple	北京 Beijing	0/5
勒芒阳光 Le Mans Sunny	北京 Beijing	0/5	金风车 Pinwheel Golden	北京 Beijing	0/5
斯皮内利 Spinelli	北京 Beijing	0/5	夏黄 Summer Yellow	北京 Beijing	5/5
Athos	北京 Beijing	0/5	特秀 Texiu	北京 Beijing	0/5
秋艳 Fall Color	哈尔滨 Harbin	0/5	食用菌 Edible fungi	北京 Beijing	0/5
橙色 Orange	北京 Beijing	0/5	神马 Jinba	海南万宁 Wanning, Hainan	0/15
桂黄 Yellow Osmanthus	哈尔滨 Harbin	0/5	黄金 Golden	海南万宁 Wanning, Hainan	2/18
草莓 Strawberry	北京 Beijing	0/5	未知 Unknown	合肥 Hefei	2/4
单白 Single White	北京 Beijing	0/5	单瓣深红 Single Red Petal	北京 Beijing	0/5

2.5 RT-PCR、克隆和测序

对斑点杂交呈阳性的‘黄金’、‘夏黄’和‘13号’品种的菊花样品进行 RT-PCR 检测, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 阳性样品均出现预期大小为 356 bp 的片段(图 3 为代表性结果), 水对照和健康对照均未出现目的片段。将目的片段回收、纯化后, 连接至 pGEM-T 载体, 并转化 DH5 α 大肠杆菌。每个品种的每个样品随机选取 2 ~ 3 个阳性克隆进行序列测定。

将测序得到的序列在 GenBank 中进行 BLAST 检索, 最后共得到 22 条序列(表 2)。大小为 353 ~ 354 bp, 与 CSVd 参考序列的相似性均大于 90%, 说明成功获得了 CSVd 的序列。其中, 从‘黄金’分离物中得到 9 条序列中, 有 6 条序列完全一致; ‘13号’分离物的 8 条序列中有 3 条序列一致; 5 条‘夏黄’分离物的序列中, 有 3 条序列相同(表 2), 表明 CSVd 的种群结构符合“准种”的模式。

2.6 序列比较分析

将所获得的 22 条序列与 GenBank 中已登录的 CSVd 序列进行比对。发现中国的 CSVd 分离物的序列与韩国和日本的分离物最为接近(表 2)。「13号」分离物中的 8 条序列均与日本分离物 CSVd 25 最为接近; ‘夏黄’分离物的 5 条序列以及‘黄金’分离物中除 HN5-1 和 5 之外的 6 条序列则最接近于韩国分离物 CSVd11, 并且‘夏黄’和‘黄金’分离物的优势变体与韩国分离物 CSVd11 的

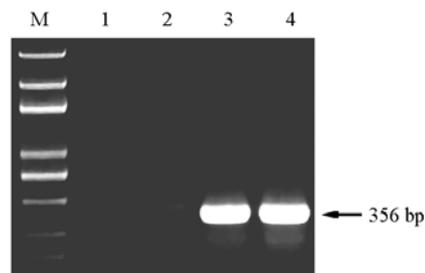


图 3 菊花样品中 CSVd 的 RT-PCR 检测

M: D2000 plus DNA marker; 1: 水对照; 2: 健康对照;
3: ‘黄金’菊花样品; 4: 阳性对照。

Fig. 3 RT-PCR analysis of CSVd in chrysanthemum

M: D2000 plus DNA marker; 1: Water control; 2: Health control;
3: Chrysanthemum ‘Golden’; 4: Positive control.

序列完全一致。这表明 CSVd 可能会通过繁殖材料的引入在中国与韩国和日本之间扩散。

表 2 CSVd 中国分离物的序列比较和变异分析

Table 2 Sequence and mutation analysis of CSVd isolates of China

品种 Cultivar	克隆编号 Name of clones	大小/bp Size	最接近的序列 The closet CSVd sequence	与最接近序列的碱基变化 Nucleotide differences with closest sequence
黄金 Golden	HN5-2, 4, 6, 7, 8, 9	354	CSVd11*韩国分离物	没有突变 No mutation
	HN5-3	354	Korea isolate	U101C;
	HN5-1	354	CSVd17 日本分离物	C195U; A298U
	HN5-5	354	Japan isolate	A298U
夏黄 Xiahuang	X-5, 6, 8	354	CSVd11 韩国分离物	没有突变 No mutation
	X-3	354	Korea isolate	G122C; A336G
13 号 Thirteenth	13-3, 7, 12	354	CSVd25 日本分离物	A169G; U190C
	13-4	354	Japan isolate	A169G; U190C; U195C
	13-8	354		A169G; U190C; A327G
	13-10	353		A169G; U190; U295-; U305C
	13-11	354		A169G; U190C; A181U
	13-14	353		A169G; U190C; C207-

* CSVd 的序号参照亚病毒 RNA 数据库 (Subviral RNA Database, <http://subviral.med.uottawa.ca/>)。

* The numbers of CSVd refer to Subviral RNA Database, <http://subviral.med.uottawa.ca/>.

2.7 二级结构预测

通过 Mfold 对获得的 22 条 CSVd 序列进行二级结构预测。与 CSVd 的参考序列 (NC002015) 相比, 所获得的 CSVd 分离物的序列中虽然有 21 个碱基发生了突变, 但并未影响其折叠成稳定的拟棒状结构 (图 4)。

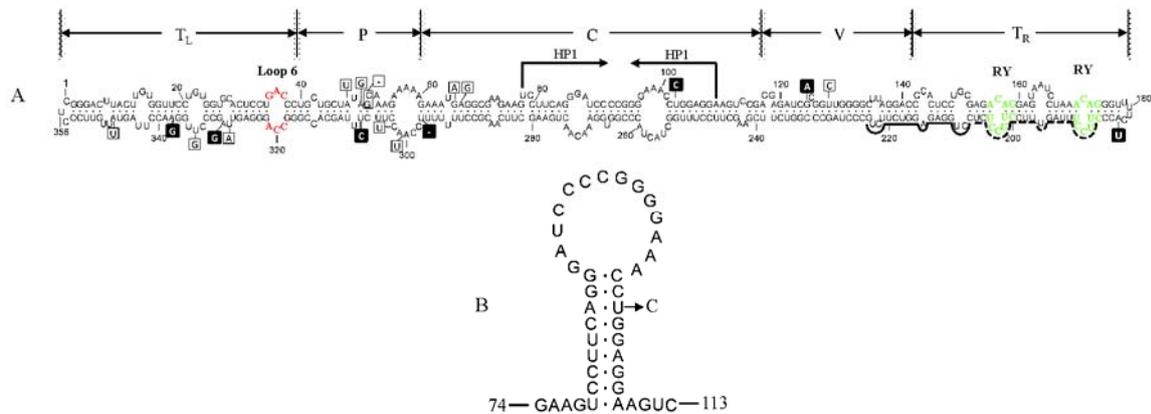


图 4 CSVd 的二级结构预测及序列变异分析

A: CSVd 的二级结构图; B: HPI 的结构图。T_L: 左末端区; P: 致病区; C: 保守区; V: 可变区; T_R: 右末端区; HPI: 发夹结构 I; RY: 类病毒 RNA 与寄主蛋白相互作用的结构基序。红色标记的是马铃薯纺锤块茎类病毒属 (*Pospiviroid*) 内保守的 Loop 6 结构基序; 绿色标记的碱基为 *Pospiviroid* 内保守 RY 结构基序; 箭头标记的代表能够形成发夹结构的序列; 实心方框标记的是本研究中的分离物特有的碱基突变; 空心方框内代表的是本研究中的分离物序列与 GenBank 中登录的序列共有的碱基突变; 实线指示的是反向引物序列, 虚线标示的是正向引物序列。

Fig. 4 The predicted secondary structure of CSVd and analysis of mutation

A: Secondary structure of CSVd; B: Structure of HPI. T_L: Terminal left; P: Pathogenicity region; C: Conserved region; V: Variable region; T_R: Terminal right; HPI: Hairpin I; RY: The structure motif mediated interaction between viroid RNA and host proteins. The red character is Loop 6 conserved for *Pospiviroid*. The green base is the structure motif RY conserved for *Pospiviroid*. The arrows indicate the bases that can fold into HPI. Solid square frames represent special mutation in this study. Blank square frames represent common mutation both in isolates of this study and the sequence deposited in GenBank. Solid line indicates sequence of reverse primer and dash line indicates sequence of forward primer.

从二级结构图可知大多数突变位于致病区内(图 4, A)。在与类病毒的复制、剪切和移动等生物学功能的实现相关的结构基序(Baumstark et al., 1997; Zhong et al., 2008; Takeda et al., 2011)内则极少发生突变。值得注意的是, 有一条序列的保守区内第 103 位的 U 变为了 C, 这改变了与类病毒复制过程中的剪切密切相关的发夹结构 I (Hairpin I, HPI) 的结构(图 4, B); 在与类病毒在寄主体内的移动有关的 Loop 6 基序内, 这 21 条序列的第 320 位的 C 均变为了 U。

3 讨论

本研究中使用斑点杂交和 RT-PCR 法对海南万宁菊花种植区内患有矮化病害的菊花样品进行了检测与鉴定, 确定其病原为 CSVd。进一步调查发现, 在中国北京地区的‘神马’品种的菊花上和安徽地区的一种未知品种的菊花上也有 CSVd 的发生。对中国 CSVd 分离物进行了克隆和测序, 序列分析表明中国 CSVd 分离物的序列与日本、韩国的 CSVd 的分离物序列最为相似。此外, 还对中国 CSVd 分离物的序列进行了二级结构预测, 所获得的 22 条 CSVd 分离物序列均能够折叠成稳定的拟棒状结构(图 4)。

植物组织具有较多的次级代谢产物, 想要获得高质量的植物总 RNA 较为困难。目前, 普遍使用昂贵的试剂盒提取植物总 RNA。本研究使用改进的 CTAB 法成功提取到了高质量的菊花总 RNA, 而且只需要 0.1 g 新鲜叶片就可以得到至少 15 μg 的总 RNA。所得总 RNA 能够满足斑点杂交和 RT-PCR 检测的要求。改进的 CTAB 法成本不仅很低, 而且操作简便。因此, 可以用于大批量样品的检测。

明确病害的传播途径是控制病害的前提。本研究中发现中国 CSVd 分离物与韩国和日本 CSVd 分离物的最为接近, 而且‘黄金’和‘夏黄’菊花分离物中的优势变体的序列与韩国分离物序列完全一致。值得提出的是, ‘黄金’是近几年中国从日本引入的用于鲜切花生产的主要品种。由此可推知, 在从日本引进繁殖材料的过程中, CSVd 可能也被引入中国境内, 并且随着种植规模的扩大迅速蔓延。本研究结果虽然为研究 CSVd 在中国和日本、韩国间的流行传播提供了线索, 但仍缺乏直接证据的支持, 而且没有对中国 CSVd 分离物的生物学特性进行更深入的研究。

菊花的生产方式和品种多样性决定了 CSVd 在不同国家呈现不同的流行态势。中国虽然早在 30 年前就报道了 CSVd 的发生(陈炜等, 1981), 可此后菊花矮化病并未流行。只是近两年, 在生产鲜切花的菊花种植区才开始出现流行的势头。然而早在 20 世纪, CSVd 就在美国、日本和欧洲一些发达国家大面积流行, 并且给当地的菊花产业造成了严重的损失(Hadidi et al., 2003), 相对落后的以小规模家庭式生产为主的生产方式是限制 CSVd 在中国流行的的重要因素。然而, 近年来中国鲜切花菊花的种植面积和生产规模快速增长。品种逐渐的单一化和繁殖材料的商业化为 CSVd 的流行提供了有利的条件。因此, 今后在菊花品种的引进和种苗的生产中要加强 CSVd 的检疫和检测。此外, 中国是菊花的原产地, 具有丰富的遗传资源。因此, 有必要对中国不同菊花品种对 CSVd 的抗性进行评价, 以期抗病品种的培育提供可利用的遗传资源。

References

- Baumstark T, Schroder A R, Riesner D. 1997. Viroid processing: Switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *The EMBO Journal*, 16: 599 - 610.
- Candresse T, Macquaire G, Brault V, Monsion M, Dunez J. 1990. 32P- and biotin-labelled in vitro transcribed cRNA probes for the detection of *Potato spindle tuber viroid* and *Chrysanthemum stunt viroid*. *Research in Virology*, 141 (1): 97 - 107.
- Candresse T, Macquaire G, Monsion M, Dunez J. 1988. Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) using nick translated probes in a dot-blot

- hybridization assay. *Journal of Virological Methods*, 20 (3): 185 - 193.
- Chen Wei, Tian Ying-chuan, Liu Yong, Peng Bo, Xia Yuan-nan, Tian Bo. 1981. Identification of *Chrysanthemum stunt viroid* in China by DNA molecular hybridization and polyacrylamide gel electrophoresis. *Chinese Science Bulletin*, 20: 886. (in Chinese)
- 陈 炜, 田颖川, 刘 勇, 彭 勃, 夏远南, 田 波. 1981. 用互补 DNA 分子杂交和聚丙烯酰胺凝胶电泳测定我国菊花矮化类病毒. *科学通报*, 20: 886.
- Chung B N, Pak H S. 2008. Seed transmission of *Chrysanthemum stunt viroid* in chrysanthemum. *Plant Pathology Journal*, 24: 31 - 35.
- Diener T O, Lawson R H. 1973. Chrysanthemum stunt: A viroid disease. *Virology*, 51 (1): 94 - 101.
- Hadidi A, Flores R, Randles J W, Semancik J S. 2003. Viroids. Enfield N H: Science Publishers: 218 - 223.
- Hooftman R, Arts M J, Shamloul A M, van Zaayen A, Hadidi A. 1996. Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* by reverse transcription-polymerase chain reaction and by tissue blot hybridization. *Acta Horticulturae*, 432: 120 - 128.
- Hosokawa M, Ueda E, Ohishi K, Otake A, Yazawa S. 2004. *Chrysanthemum stunt viroid* disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta*, 220 (1): 64 - 70.
- Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, Kinard G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154: 48 - 55.
- Li Shi-fang, Li Ming-fu, Yi Feng-yuan. 2002. Establishment and comparison of two methods for detecting *Chrysanthemum stunt viroid*. *Plant Protection*, 28: 48 - 50. (in Chinese)
- 李世访, 李明福, 衣丰源. 2002. 菊花矮化类病毒两种检测方法的建立与比较. *植物保护*, 28: 48 - 50.
- Matsushita Y, Penmetcha K K. 2009. *In vitro*-transcribed *Chrysanthemum stunt viroid* RNA is infectious to chrysanthemum and other plants. *Phytopathology*, 99: 58 - 66.
- Mosch W H M, Huttinga H, Hakkaart F A, De Bokx J A. 1978. Detection of chrysanthemum stunt and potato spindle tuber viroids by polyacrylamide gelelectrophoresis. *European Journal of Plant Pathology*, 84 (3): 85 - 93.
- Mumford R A, Walsh K, Boonham N. 2000. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *EPPO Bulletin*, 30 (3 - 4): 431 - 435.
- Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. 1999. A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 77 (1): 47 - 58.
- Takeda R, Petrov A I, Leontis N B, Ding B. 2011. A three-dimensional RNA motif in *Potato spindle tuber viroid* mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. DOI: 10.1105/tpc.110.081414.
- Zhong X, Archual A J, Amin A A, Ding B. 2008. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell*, 20: 35 - 47.
- Zhu Shui-fang, Shu Xiu-zhen. 1991. A two-dimensional electrophoretic detection of *Chrysanthemum stunt viroid*. *Plant Quarantine*, 5: 173 - 174. (in Chinese)
- 朱水芳, 舒秀珍. 1991. 菊花矮化类病毒的双向电泳检测. *植物检疫*, 5: 173 - 174.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31: 3406 - 3415.