

芋花叶病毒的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因序列分析

施世明¹, 王国平^{1,2}, 徐文兴¹, 王利平¹, 洪霓^{1,2,*}

(¹华中农业大学植物科技学院, 湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 武汉 430070; ²华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 采用 RT-PCR 技术对采自中国湖北、浙江和山东的 91 份芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] 样品的芋花叶病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV) 进行了检测, 检出率为 26.4%。对其中 14 个 DsMV 分离物的 317 bp 扩增产物 (为外壳蛋白基因的一部分) 序列分析的结果显示, 各分离物内的核苷酸变异相对较低, 而分离物间存在较大的分子变异, 相似性为 68.3%~97.8%。对来自湖北和浙江的 2 个 DsMV 分离物 DsMV-SCS 和 DsMV-JH 的外壳蛋白基因 (coat protein gene, *cp*) 进行了测序, 全长分别为 951 bp 和 987 bp, 二者 *cp* 核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 79.0%和 82.3%, 与已报道 DsMV 的 *cp* 核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 73.0%~92.1%和 74.8%~98.2%, 在构建的系统发育树上聚在两个不同的簇, 各 DsMV 分离物的系统进化关系与其寄主和地理来源无显著相关性。

关键词: 芋; 芋花叶病毒; RT-PCR; 外壳蛋白基因; 序列分析

中图分类号: S 632.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 03-0509-07

The Detection of *Dasheen mosaic virus* by RT-PCR and Sequence Analysis of Its Coat Protein Gene

SHI Shi-ming¹, WANG Guo-ping^{1,2}, XU Wen-xing¹, WANG Li-ping¹, and HONG Ni^{1,2,*}

(¹College of Plant Science and Technology, Key Lab of Crop Disease Monitoring and Safety Control in Hubei, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²National Key Lab of Agromicrobiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Reverse transcription PCR (RT-PCR) was used for the detection of *Dasheen mosaic virus* (DsMV) in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] from Hubei, Zhejiang and Shandong Provinces. Results revealed that the average viral infection frequency in 91 collected taro samples was 26.4%. RT-PCR products of 317 bp (covering partial coat protein gene) from 14 isolates were sequenced. Results showed that the obtained sequences had high intra-isolate nucleotide similarities, but inter-isolate nucleotide similarities were varied from 68.3% to 97.8%. The *cp* genes of two DsMV isolates named DsMV-SCS and DsMV-JH were sequenced, and their sizes were 951 bp and 987 bp, respectively. Their *cp* genes shared similarities of 79.0% at nucleotide (nt) level and 82.3% at amino acid (aa) level to each other and similarities of 73.0% - 92.1% at nt level and 74.8% - 98.2% at aa level to reported *cp* sequences of

收稿日期: 2011-09-19; 修回日期: 2011-11-24

基金项目: 国家农业行业专项计划项目 (nyhyzx200903017-08)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: whni@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87283278)

DsMV, respectively. The phylogenetic trees constructed based on nucleotide and deduced amino acid sequences of the *cp* of DsMV showed that isolates DsMV-SCS and DsMV-JH clustered into two different groups. There was no obvious correlation between phylogenetic positions and host or geographical origins of different DsMV isolates.

Key words: taro; *Dasheen mosaic virus*; RT-PCR; coat protein gene; sequence analysis

目前世界各国报道的芋病毒主要有 8 种, 其中芋花叶病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV) 是发生最普遍的病毒之一 (Zettler, 1987; 杜红梅 等, 2006)。DsMV 最早由 Zettler 等 (1970) 在美国发现, 随后其它国家相继报道有该病毒发生 (Zettler, 1987; Ram et al., 2003; Revill et al., 2005; Farreyrol et al., 2006; Ha et al., 2008)。该病毒主要危害天南星科植物 (陈集双和李德葆, 1996), 感染 DsMV 的芋植株通常表现为叶片产生羽状褪绿, 花叶, 皱缩, 叶脉和茎坏死等症状 (李永伟, 2002)。在自然条件下, 该病毒主要通过无性繁殖材料及多种蚜虫传播, 也可经人工汁液摩擦接种传播 (Abo et al., 1977)。DsMV 为马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员, 基因组为约 10 kb 的单链正义 RNA, 编码 1 个长的开放式阅读框 (ORF)。已有的研究表明, 该病毒的不同分离物存在高度的变异, 且其外壳蛋白基因 (*cp*) 的变异相对较大 (Chen et al., 2001)。

目前有关中国芋上 DsMV 分子特性的研究较少, 仅有该病毒 *cp* 基因部分序列的报道。本研究对中国部分地区芋上的 DsMV 进行了分子检测及部分分子特性的研究, 旨在进一步明确 DsMV 在中国栽培芋上的侵染及危害状况, 并为建立有效的病毒检测技术提供重要的分子信息。

1 材料与方法

1.1 材料及其叶片组织总 RNA 的提取

2010 年 3 月—2011 年 7 月分别从湖北、浙江、山东共收集芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] 叶片样品 91 份, 其中武汉市蔬菜科学研究所的 38 份样品采自国家种质武汉水生蔬菜资源圃, 其它样品来自生产田。多数样品植株的叶片表现羽状花叶或褪绿斑等病毒病症状。用于该病毒检测的引物 DsMV-L/DsMV-R: 5'-GGGCTTGGGTGATGATGGA-3'/5'-GCCTTTCAGTGTTCTCGCTTG-3'参照陈集双 (2006) 报道的序列合成, 扩增片段为 357 bp, 扩增区域为 *cp* 基因中间部分核心序列; 用于扩增 *cp* 序列的引物 P2F/P2R: 5'-AGGTTGTATTGCAGGCAGATG-3'/5'-GCCAATAACTGTGGCCTGTT-3'根据 Guillermo 等 (2009) 报道的序列合成, 扩增片段约 1 kb, 扩增区域为部分复制酶基因 (polymerase *Nib*)、整个 *cp* 基因和部分 3'不翻译区 (3'-UTR)。所用引物由上海生工生物技术有限公司合成。

取嫩叶 0.1 g, 加液氮磨碎, 快速转入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL RNA 提取缓冲液 (含 50% 异硫氰酸胍, $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚等) 充分混匀, 室温静置 5 min 后离心, 上清液经氯仿抽提两次后加入 2/3 体积的异丙醇沉淀核酸, 沉淀物经 75% 乙醇洗涤 2 次, 风干后溶于 30 μL DEPC 处理水, -20°C 保存。

1.2 RT-PCR

以提取的总 RNA 为模板, 合成 cDNA 第一链。

反应体系为 20 μL , 含 $5 \times$ 反转录缓冲液 4 μL 、dNTPs ($5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL 、RNA 酶抑制剂 (RNasin, $40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、M-MLV ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、随机引物 ($100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL 、

RNA 模板 3 μL 和 DEPC 处理水 10 μL 。

PCR 反应总体积为 25 μL , 含 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、dNTPs ($5 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL 、正反向引物各 0.5 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、cDNA 2 μL 和灭菌去离子水 18.8 μL 。

采用引物 DsMV-L/DsMV-R 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。采用引物 P2F/P2R 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.3 扩增产物克隆及测序

RT-PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下切取含目标产物的凝胶, 按琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒 V3.0 (北京道普生物科技有限公司) 方法说明回收目标 DNA, 与载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株感受态细胞, 涂布在含 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 的 LB 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

待菌落长出后随机挑取一定数量的白色单菌落, 在含 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 液体培养基中震荡培养, PCR 鉴定为阳性克隆后, 将菌液送由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。DsMV 的序列比对及 *cp* 推导编码氨基酸序列采用生物学软件 Clustalx (1.81) 和 DNAMAN (5.2.2) 完成, 系统发育树构建采用 MEGA4.1 软件中的邻接法 (neighbor-joining) 进行。采用的已报道的 DsMV *cp* 参照序列见表 1。

表 1 用于序列比对和系统进化分析的 DsMV 分离物来源及其 *cp* 序列 GenBank 登录号
Table 1 Origin and GenBank accession numbers of the *cp* of DsMV isolates used for sequence alignments and phylogenetic analyses

| 寄主 Host | 分离物 Isolate | 来源 Source | 登录号 Accession No. | 参考文献 Reference |
|--|----------------|----------------------|----------------------|---|
| 芋 <i>Colocasia esculenta</i> | DsMV-1 | 新西兰 New Zealand | AY994104 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| | DsMV-2 | 新西兰 New Zealand | AY994105 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| | DsMV-U1 | 美国 America | U00122 | Pappu et al., 1994 |
| | DsMV-U2 | 美国 America | U08124 | Pappu et al., 1994 |
| | DsMV-VNCE1 | 越南 Vietnam | DQ925464 | Ha et al., 2008 |
| 马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i> | DsMV-M13 | 中国浙江 Zhejiang, China | AJ298033 | Chen et al., 2001 |
| | DsMV-S | 中国浙江 Zhejiang, China | AF511485 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| 魔芋 <i>Amorphophallus rivieri</i> | DsMV-YN80 | 中国云南 Yunnan, China | EF199550 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| 疣柄魔芋 <i>Amorphophallus paeoniifolius</i> | DsMV-Amp6 | 印度 India | HQ207533 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| 贝母 <i>Caladium hortulanum</i> | DsMV-Ch | 美国 America | AF048981 | Li et al., 1994 |
| 香草 <i>Vanilla planifolia</i> | DsMV-CI-AT | 库克群岛 Cook Islands | AJ616720 | Farreyrol et al., 2006 |
| 天南星科植物 Araceae family plants | DsMV-TW | 中国台湾 Taiwan, China | AF169832 | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |

2 结果与分析

2.1 不同来源芋中 DsMV 的 RT-PCR 检测及序列相似性分析

采用引物 DsMV-L/DsMV-R 对 DsMV 进行 RT-PCR 检测的结果 (表 2) 显示, 91 份芋样品中有 24 份的 DsMV 检查结果为阳性, 检出率为 26.4%, 其中来自湖北不同田间的 78 份样品的 DsMV 检出率为 21.1%~42.9%; 来自浙江金华的 10 份样品的 DsMV 检出率为 40.0%; 来自山东的 3 份随机收集样品中未检测到该病毒。

表 2 不同来源芋的 DsMV RT-PCR 检测结果
Table 2 RT-PCR detection of DsMV in *Colocasia esculenta* plants from different fields

| 样品来源 Sample source | 样品代号 Sample ID | 样品数 Number of detected samples | 阳性样品数 Number of positive samples | 发生频率/% Frequency |
|-----------------------|---|--------------------------------------|--|---------------------|
| 湖北 Hubei Province | 蔡甸索河 Caidian Suohe | SH | 7 | 3 |
| | 蔡甸马家渡 Caidian Majiadu | MJD | 10 | 3 |
| | 仙桃 Xiantao | XT | 4 | 1 |
| | 武汉蔬菜所 Wuhan Vegetable Research Institute | SCS | 38 | 9 |
| | 华中农业大学 Huazhong Agricultural University | HN | 19 | 4 |
| | | | | 21.1 |
| 浙江 Zhejiang Province | 金华 Jinhua | JH | 10 | 4 |
| 山东 Shandong Province | 临沂 Linyi | LY | 3 | 0 |
| 总计 Total | | 91 | 24 | 26.4 |

对其中 14 个 DsMV 阳性样品的 RT-PCR 产物进行克隆, 每份产物随机选取 1 ~ 4 个克隆进行测序, 共得到 30 个克隆的序列, 除来自样品 JH-4 的 1 个克隆为 316 bp 外, 各克隆产物全长均为 317 bp (不含引物序列)。

序列比对的结果显示, 各分离物内的分子变异相对较低, 除 JH-4 的 1 个分子变种与其它 2 个分子变种的核苷酸相似性仅 70.5% 外, 其它各分离物内的克隆间核苷酸相似性均达 89.9% ~ 100% (表 3)。

分离物间存在较大的分子变异, 除分离物 HN-5 与 HN-6 的核苷酸相似性达 97.8% 外, 其它各分离物间相似性为 68.3% ~ 95.6% (表 4)。

表 3 DsMV 分离物内 cp 部分核苷酸序列相似性
Table 3 Percent nucleotide identities intra-isolate based on partial cp sequences

| 分离物 Isolates | 克隆数 Clone number | 分离物内相似性/% Intra-isolate similarities |
|-----------------|---------------------|---|
| MJD-1 | 4 | 99.7 ~ 100.0 |
| MJD-9 | 2 | 98.1 |
| JH-2 | 3 | 94.1 ~ 95.9 |
| JH-4 | 3 | 70.5 ~ 96.8 |
| JH-5 | 3 | 99.7 ~ 100.0 |
| JH-7 | 3 | 91.8 ~ 96.5 |
| SCS-1 | 3 | 89.9 ~ 100.0 |
| SCS-2 | 3 | 93.4 ~ 100.0 |
| SCS-3 | 1 | - |
| SH-3 | 1 | - |
| XT-2 | 1 | - |
| HN-3 | 1 | - |
| HN-5 | 1 | - |
| HN-6 | 1 | - |

表 4 DsMV 分离物间 cp 部分核苷酸序列相似性
Table 4 Percent nucleotide identities inter-isolate based on partial cp sequences

| 分离物 Isolates | 克隆数 Clone number | 分离物间相似性/% Intra-isolate similarities | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|------|------|------|------|
| | | MJD-1 | MJD-9 | JH-2 | JH-4 | JH-5 | JH-7 | SCS-1 | SCS-2 | SCS-3 | SH-3 | XT-2 | HN-3 | HN-5 |
| MJD-1 | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| MJD-9 | 2 | 84.2 ~ 85.2 | | | | | | | | | | | | |
| JH-2 | 3 | 91.5 ~ 93.7 | 85.8 ~ 88.0 | | | | | | | | | | | |
| JH-4 | 3 | 75.6 ~ 85.2 | 72.1 ~ 89.0 | 73.0 ~ 86.8 | | | | | | | | | | |
| JH-5 | 3 | 94.3 ~ 95.0 | 84.9 ~ 85.2 | 92.4 ~ 95.0 | 75.6 ~ 84.9 | | | | | | | | | |
| JH-7 | 3 | 90.2 ~ 92.7 | 83.3 ~ 85.8 | 89.6 ~ 93.7 | 75.6 ~ 84.9 | 90.9 ~ 92.7 | | | | | | | | |
| SCS-1 | 3 | 90.2 ~ 93.4 | 84.9 ~ 87.1 | 90.5 ~ 94.0 | 75.9 ~ 85.5 | 90.9 ~ 93.7 | 89.3 ~ 92.7 | | | | | | | |
| SCS-2 | 3 | 83.3 ~ 83.9 | 87.7 ~ 89.6 | 83.0 ~ 87.7 | 68.3 ~ 94.0 | 82.6 ~ 83.5 | 80.4 ~ 84.2 | 81.4 ~ 85.4 | | | | | | |
| SCS-3 | 1 | 83.6 ~ 83.9 | 88.0 ~ 88.3 | 84.9 ~ 86.8 | 70.5 ~ 92.7 | 83.0 ~ 83.3 | 82.3 ~ 84.2 | 83.0 ~ 84.5 | 92.1 ~ 97.2 | | | | | |
| SH-3 | 1 | 91.8 ~ 92.1 | 82.3 | 89.0 ~ 91.8 | 74.9 ~ 81.4 | 92.4 ~ 92.7 | 90.5 ~ 92.4 | 89.6 ~ 90.9 | 79.8 ~ 80.1 | 80.4 | | | | |
| XT-2 | 1 | 84.5 ~ 84.9 | 95.3 ~ 95.9 | 85.8 ~ 87.4 | 72.4 ~ 88.6 | 84.5 ~ 84.9 | 83.6 ~ 85.2 | 85.8 | 87.1 ~ 88.9 | 88.6 | 81.7 | | | |
| HN-3 | 1 | 94.3 ~ 94.6 | 83.9 | 91.8 ~ 93.7 | 76.2 ~ 83.0 | 94.3 ~ 94.6 | 91.8 ~ 93.4 | 91.8 ~ 93.4 | 81.7 ~ 82.6 | 82.6 | 93.7 | 83.9 | | |
| HN-5 | 1 | 93.4 ~ 93.7 | 84.2 ~ 84.9 | 92.4 ~ 94.3 | 75.6 ~ 83.6 | 94.3 ~ 94.6 | 92.1 ~ 93.1 | 93.1 ~ 93.4 | 82.6 ~ 83.5 | 83.6 | 91.8 | 84.2 | 95.6 | |
| HN-6 | 1 | 92.4 ~ 92.7 | 85.8 ~ 86.4 | 91.8 ~ 95.3 | 76.2 ~ 85.5 | 93.4 ~ 93.7 | 90.9 ~ 93.4 | 91.8 ~ 95.3 | 84.2 ~ 85.1 | 84.9 | 91.5 | 85.8 | 93.4 | 97.8 |

2.2 DsMV *cp* 序列分析

采用引物 P2F/P2R 分别从采自武汉市蔬菜所样品 SCS-3 和浙江金华样品 JH-5 中扩增获得预期大小的产物，对扩增产物进行了克隆和测序。

序列分析结果显示，SCS-3 的 4 个克隆产物的全长为 998 bp，而 JH-5 的 3 个克隆产物全长为 1 034 bp，均包含 DsMV 的部分 *NIb* (14 bp) 和部分 3'-UTR (33 bp) 及完整的 *cp*。两个分离物内的各克隆间核苷酸序列相似性均为 99%以上，而分离物 SCS-3 和 JH-5 扩增片段的核苷酸序列相似性仅为 81.6%~82.0% (详细数据未列出)，且二者的 *cp* 大小存在差异，分离物 SCS-3 的 *cp* 为 951 bp，分离物 JH-5 的 *cp* 为 987 bp。

从这两个 DsMV 分离物中各选取一个代表性克隆的 *cp* 序列 (分别命名为 DsMV-SCS 和 DsMV-JH)，与 GenBank 登录的该病毒 *cp* 序列 (表 1) 进行多重比对，结果显示不同来源 DsMV 分离物的 *cp* 存在高度变异，核苷酸序列相似性为 68.6%~92.6%，氨基酸序列相似性为 72.2%~98.2%。本研究获得的分离物 DsMV-SCS 和 DsMV-JH 与已报道的 DsMV 的 *cp* 的核苷酸相似性分别为 73.0%~78.9%和 74.3%~92.1%，氨基酸相似性分别为 77.0%~86.5%和 74.8%~98.2% (表 5)。

表 5 DsMV 不同分离物 *cp* 核苷酸 (左下) 和氨基酸 (右上) 序列相似性比较

Table 5 Percent nucleotide identities (below diagonal) and amino acid identities (above diagonal) between DsMV isolates based on *cp* sequences

| 分离物 | Isolates | M13 | S | U2 | CH | TW | U1 | YN80 | JH | VNCe1 | CI-AT | 1 | 2 | Amp6 | SCS |
|-------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|
| M13 | | - | 95.9 | 95.2 | 93.6 | 92.4 | 89.2 | 86.6 | 87.6 | 83.4 | 80.9 | 82.8 | 82.5 | 76.5 | 86.5 |
| S | | 91.7 | - | 95.2 | 92.0 | 93.0 | 88.6 | 86.0 | 86.7 | 83.4 | 80.6 | 81.9 | 81.6 | 77.1 | 85.8 |
| U2 | | 89.4 | 90.4 | - | 93.0 | 94.9 | 91.4 | 89.2 | 89.5 | 83.1 | 80.6 | 82.8 | 82.8 | 75.8 | 84.8 |
| CH | | 88.4 | 87.6 | 88.0 | - | 91.1 | 89.1 | 87.2 | 87.9 | 84.3 | 79.2 | 82.1 | 82.1 | 75.7 | 83.8 |
| TW | | 87.6 | 87.9 | 88.1 | 86.3 | - | 87.2 | 85.4 | 85.7 | 80.5 | 77.5 | 81.8 | 81.8 | 76.7 | 83.9 |
| U1 | | 86.3 | 85.9 | 86.1 | 84.8 | 83.4 | - | 97.0 | 96.7 | 79.9 | 76.9 | 80.2 | 79.9 | 75.4 | 83.2 |
| YN80 | | 84.4 | 83.9 | 85.1 | 82.7 | 82.3 | 92.6 | - | 98.2 | 79.9 | 76.6 | 80.5 | 80.5 | 75.1 | 82.3 |
| JH | | 84.1 | 84.8 | 85.7 | 83.4 | 82.6 | 89.7 | 92.1 | - | 80.5 | 76.3 | 80.5 | 79.6 | 74.8 | 82.3 |
| VNCe1 | | 83.8 | 83.7 | 83.4 | 84.6 | 81.9 | 79.6 | 80.9 | 81.6 | - | 74.0 | 85.8 | 84.3 | 73.4 | 78.8 |
| CI-AT | | 78.2 | 77.4 | 76.6 | 75.7 | 75.4 | 74.4 | 75.4 | 75.3 | 72.1 | - | 77.6 | 77.9 | 72.2 | 76.3 |
| 1 | | 78.1 | 78.2 | 78.6 | 78.1 | 77.1 | 77.5 | 78.2 | 77.7 | 77.0 | 78.1 | - | 93.1 | 72.5 | 81.3 |
| 2 | | 78.6 | 78.6 | 79.7 | 78.3 | 78.3 | 79.4 | 78.7 | 78.8 | 76.4 | 78.4 | 87.2 | - | 72.2 | 80.7 |
| Amp6 | | 74.3 | 74.1 | 73.9 | 75.2 | 73.9 | 74.7 | 73.8 | 74.3 | 73.1 | 68.6 | 70.3 | 71.1 | - | 77.0 |
| SCS | | 78.7 | 78.9 | 78.1 | 77.5 | 77.3 | 77.9 | 77.9 | 79.0 | 76.4 | 73.0 | 74.4 | 75.4 | 78.9 | - |

根据 DsMV *cp* 基因核苷酸序列及推导编码氨基酸序列建立系统进化树的结果表明，所有报道的 DsMV 分离物可分为两大簇。

本研究中所获分离物 DsMV-SCS 和印度疣柄魔芋的分离物 DsMV-Amp6 聚为一簇 (II)；DsMV-JH 则与来自中国云南的魔芋分离物 DsMV-YN80 亲缘关系最近，与其它分离物聚为较大的一簇 (I)，在该簇中存在两个明显的亚分支 (I a 和 I b)。

各分离物的 *cp* 基因系统进化关系与其寄主及地理来源无明显的相关性，已报道的来源于芋的 DsMV 分离物 *cp* 基因序列有 7 条，其中 5 条来自中国大陆 (即 DsMV-M13、DsMV-S、DsMV-YN80 和本研究中测定的 DsMV-SCS 和 DsMV-JH)，这些分离物与其它寄主或地理来源的分离物分别聚在不同的分支或亚分支中 (图 1, A、B)。

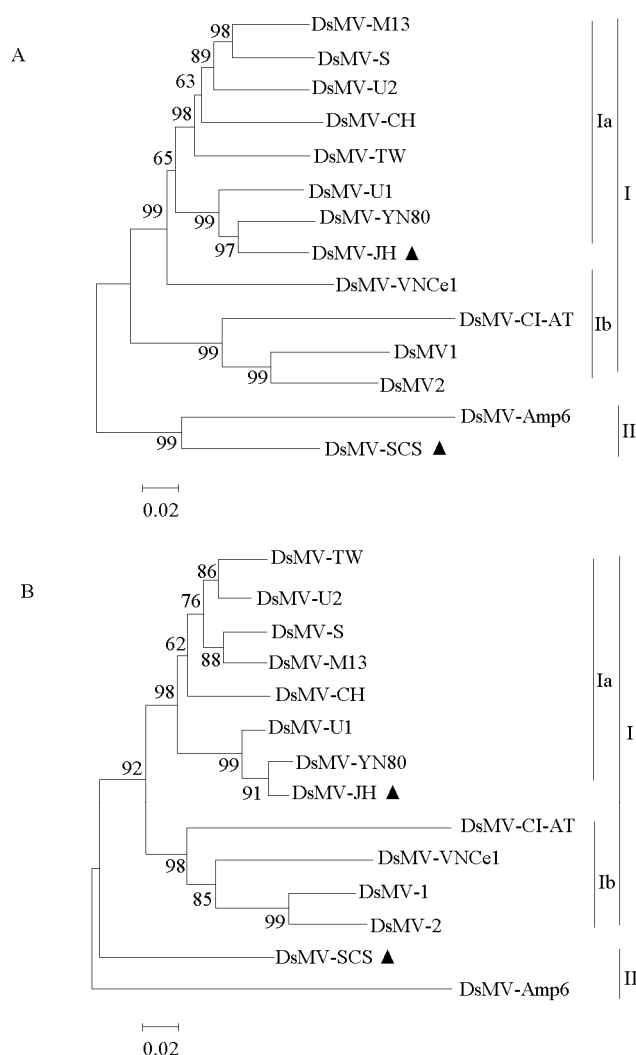


图 1 芋花叶病毒 *cp* 核苷酸序列 (A) 和推导编码氨基酸序列 (B) 的系统进化分析

▲ 本研究中鉴定的分离物。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Dasheen mosaic virus* (DsMV) based on nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences of its *cp*

▲ The isolates sequenced in this study.

3 讨论

本研究结果显示, DsMV 侵染在中国保存和栽培芋上均有发生, 但不同地区及田块的芋受侵染状况存在一定的差异。分析的 91 份样品中大部分样品在田间表现明显的病毒病及类似病害症状, 而采用 RT-PCR 检测 DsMV 的阳性率仅为 26.4%, 分析其原因之一是, DsMV 虽可引起典型的花叶症状, 但由于侵染芋的病毒有多种可引起不同程度的叶片花叶症状, 且不同病毒的混合侵染对植物病害症状表现也会产生影响 (Revill et al., 2005), 这些样品中是否存在其它病毒还有待进一步明确, 因此尚不能根据症状表现确定病毒种类。DsMV 具有高度的分子变异, 已报道的不同来源 DsMV 分离物的 *cp* 大小为 936 ~ 1 008 bp, 推导编码的外壳蛋白为 312 ~ 336 个氨基酸, 该基因 5'端及编码蛋白的 N 端多个位点存在连续的核苷酸及氨基酸缺失或插入 (数据未列出)。

本试验中采用的引物虽是根据 *cp* 相对保守区域设计的, 但该基因的高度变异特点有可能影响 RT-PCR 检测灵敏度, 各分离物的 CP 氨基酸序列差异也会直接影响常规血清学检测的效果。因此, 随着对该病毒基因组分子组成研究的深入, 有必要开发具有更高通量的分子检测技术。蚜虫对该病毒的传播起着重要的作用 (Abo et al., 1977), 但来源于同一地区栽培芋及同一保存圃不同品种芋上的 DsMV 分离物也存在较高的分子变异, 推测这种变异可能与其最初来源有更密切的关系。目前仅报道有 1 个来自马蹄莲的 DsMV 分离物 (DsMV-M13) 全长基因组序列 (Chen et al., 2001), 不同 DsMV 分离物在基因组结构上是否存在差异, 及其 *cp* 高度分子变异特点是否与该病毒株系及致病性分化有关, 还有待进一步研究。

References

- Abo El-Nil M M, Zettler F W, Hiebert E. 1977. Purification, serology and some physical properties of *Dasheen mosaic virus*. *Phytopathology*, 67: 1445 - 1450.
- Chen Jiong, Chen Jian-ping, Chen Ji-shuang, Adams M J. 2001. Molecular characterisation of an isolate of *Dasheen mosaic virus* from *Zantedeschia aethiopica* in China and comparisons in the genus *Potyvirus*. *Arch Virol*, 146 (9): 1821 - 1829.
- Chen Ji-shuang. 2006. The molecular diagnosis of viruses infecting *Araceae* plants and the research of *Pinellia ternate*. Zhejiang: Zhejiang University Press: 24 - 25. (in Chinese)
- 陈集双. 2006. 天南星科植物病毒的分子诊断和半夏研究. 浙江: 浙江大学出版社: 24 - 25.
- Chen Ji-shuang, Li De-bao. 1996. *Dasheen mosaic virus* from thirteen *Araceae* crops in China. *Acta Microbiologica Sinica*, 36 (2): 126 - 131. (in Chinese)
- 陈集双, 李德葆. 1996. 我国 13 种天南星科作物上的芋花叶病毒. *微生物学报*, 36 (2): 126 - 131.
- Du Hong-mei, Tang Dong-mei, Lu Ya-jun, Huang Dan-feng. 2006. Initial Investigations of *Dasheen mosaic virus* occurring in Chunming County. *Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science*, 24 (2): 181 - 184. (in Chinese)
- 杜红梅, 唐东梅, 陆雅君, 黄丹枫. 2006. 崇明芋花叶病毒病的初步鉴定. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 24 (2): 181 - 184.
- Farreyrol K, Pearson M N, Grisoni M, Cohen D, Beck D. 2006. *Vanilla mosaic virus* isolates from French Polynesia and the Cook Islands are *Dasheen mosaic virus* strains that exclusively infect vanilla. *Arch Virol*, 151 (5): 905 - 919.
- Guillermo Reyes, Jon N E, Marie Nyman, Anders Kvarnheden. 2009. Sequence characterization of *Dasheen mosaic virus* isolates from cocoyam in Nicaragua. *Arch Virol*, 154: 159 - 162.
- Ha C, Revill P, Harding R M, Vu M, Dale J L. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Arch Virol*, 153 (1): 45 - 60.
- Li R H, Zettler F W, Hiebert E, Purcifull D E. 1994. Nucleotide sequence and expression of the coat protein (*CP*) gene of a *Dasheen mosaic virus* isolate (DsMV-Ch) from *Caladium*. *Phytopathology*, 84: 1105.
- Li Yong-wei. 2002. Studies on viruses infecting *Araceae* plant [M. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 李永伟. 2002. 天南星科植物病毒研究[硕士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Pappu S S, Pappu H R, Rybicki E P, Niblett C L. 1994. Unusual amino-terminal sequence repeat characterizes the capsid protein of *Dasheen mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 75: 239 - 242.
- Ram R, Joshi A, Verma N, Kulshrestha S, Raikhy G, Hallan V, Zaidi A A. 2003. First report of *Dasheen mosaic virus* infecting four ornamental aroids in India. *Plant Pathology*, 52: 411.
- Revill P A, Jackson G V H, Hafner G J, Yang I, Maino M K, Dowling M L, Devitt L C, Dale J L, Harding R M. 2005. Incidence and distribution of viruses of taro (*Colocasia esculenta*) in Pacific Island countries. *Australasian Plant Pathology*, 34: 327 - 331.
- Zettler F W. 1987. *Dasheen mosaic virus* infecting taro in People's Republic of China. *Plant Disease*, 71 (9): 837 - 839.
- Zettler F W, Foxe M J, Hartman R D, Edwardson J R, Christie R G. 1970. Filamentous viruses infecting *Dasheen* and other *Araceous* plants. *Journal Phytopathology*, 60 (6): 983 - 987.