

喇叭水仙中百合斑驳病毒的 RT-PCR 检测及序列分析

刘 博¹, 明 军^{1*}, 刘 春¹, 罗凤霞², 王春城³, 单宏臣³, 王晓武¹, 穆 鼎¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 金陵科技学院园艺学院, 南京 210038; ³ 北京园林绿化局花卉产业处, 北京 100029)

摘 要: 根据基因库中已发表的百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV) 外壳蛋白基因序列设计引物, 通过 RT-PCR 从喇叭水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*) ‘Pink-cham’ 样品中扩增出 1 条大小与试验设计相符的 553 bp 的特异性 LMoV RT-PCR 带。扩增产物序列分析表明: 与 GenBank 中百合斑驳病毒百合分离物核苷酸相似性在 90% 以上。将该序列翻译为外壳蛋白的氨基酸序列 ABW 16938, 发现它完全存在于 GenBank 登录的 LMoV 病毒外壳蛋白序列 NP-945145 中, 确认喇叭水仙该样品感染了百合斑驳病毒。

关键词: 喇叭水仙; 百合斑驳病毒; RT-PCR; 病毒检测

中图分类号: S 682 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 12-1843-06

Detection and Sequence Analysis of Lily mottle virus in *Narcissus pseudonarcissus* from the Netherlands by RT-PCR Technique

LIU Bo¹, MING Jun^{1*}, LIU Chun¹, LUO Feng-xia², WANG Chun-cheng³, SHAN Hong-chen³, WANG Xiao-wu¹, and MU Ding¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; ³ Beijing Municipal Bureau of Parks and Afforestation Division of Flower Industry, Beijing 100029, China)

Abstract: *Lily mottle virus* (LMoV) was detected in *Narcissus pseudonarcissus* using one set of specific primer by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). A 553 bp DNA fragment was amplified from the sample of ‘Pink-cham’ using primers L1 (5’-TGGGCACCTTGTGAATTAC-3’) and L2 (5’-TGCTGTATGCCCTCTCCGTGC-3’). The primer was designed according to the published sequence of the coat protein of LMoV in the GenBank. Nucleotide sequence of the fragment (GenBank accession No. EU167936) showed more than 98% identity with other isolates (GenBank accession No.: AJ748256, AJ564636, AB053256, AF531458, AJ564637, AJ748257). Remarkably high similarity in the nucleotide has been observed despite of their different origins. Besides, amino acid sequence of the amplified virus fragments (GenBank accession No. ABW16938) is overlapped by the amino acid sequence of LMoV coat protein (GenBank accession No. NP-945145).

Key words: *Narcissus pseudonarcissus*; *Lily mottle virus*; RT-PCR; virus detection

收稿日期: 2008 - 07 - 08; 修回日期: 2008 - 09 - 08

基金项目: 国家 ‘863’ 计划项目 (2006AA100109); 国家科技支撑计划项目 (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)

喇叭水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*), 别名洋水仙、漏斗水仙, 为石蒜科水仙属具肥大鳞茎的多年生草本植物。中国从 19 世纪末开始从荷兰引进喇叭水仙 (中国农业百科全书观赏园艺卷编辑委员会, 1996)。目前对喇叭水仙的携带病毒情况以及是否对中国水仙 (*Narcissus tazetta* var *chinensis*) 构成危害等相关研究较少。

据报道, 喇叭水仙可能存在 4 种以上 PVY 组病毒单独或复合侵染 (Brunt, 1971; Asjes, 1976; Bos, 1976)。随着 PVY 组病毒分子结构及其功能研究的不断深入 (Langeveld et al, 1991; Rosner et al, 1992; Dekker et al, 1993), 利用编码外壳蛋白核酸序列基因的同源性差异可以作为诊断和鉴定 PVY 组病毒的依据 (Shukla & Ward, 1989; Robertson et al, 1991; Rosner et al, 1992)。在我国, 仅见陈枝楠 (1995) 报道喇叭水仙上存在 4 种以上 PVY 组病毒侵染, 它们可能是 TBV、NYSV、NSSV 和 OnYDV。

百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV) 是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的重要病毒之一, 分布范围较广, 在意大利、日本、以色列、荷兰、中国台湾等地均有报道。该病毒是危害百合属和郁金香属作物的重要病毒病原 (Asjes, 2000; Zheng et al, 2003; 刘文洪 等, 2004; 徐榕雪 等, 2007), 在水仙上未见报道。

为掌握进口水仙病毒病情况, 本研究中参考设计了一对特异引物, 利用 RT-PCR 技术, 对部分进口材料进行相关病毒的检测分析, 首次在喇叭水仙中检测到 PVY 组病毒属另一重要成员 LMoV。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 2006 年从荷兰进口的喇叭水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*) ‘Pink-charm’ 和 ‘Fortissimo’ 品种, 风信子 (*Hyacinthus orientalis*) ‘Woodstock’ 和 ‘Fondant’ 品种, 东方百合 (Oriental hybrids lily) ‘Sorbonne’、‘Siberia’ 和 ‘Tiber’ 品种为试验材料。试验于 2007 年 8 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所生物技术室完成。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

采用北京百泰克公司的 RNA 提取试剂盒提取喇叭水仙鳞茎组织总 RNA。取 0.1 g 植物组织用液氮研磨, 放入盛有 1 mL 裂解液的离心管中, 振荡混匀, 室温静置 5 min。4 °C 条件下 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液。加 0.2 mL 氯仿, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层无色水相转移到新管中, 加入 1 倍体积 70% 的乙醇, 混匀。得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱中, $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 s, 弃掉废液。加蛋白液和漂洗液以及离心的步骤均按说明进行。取出吸附柱, 转入一个新的 RNase free 的离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 50 μL ddH₂O (RNase free), 室温放置 2 min, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min。-20 °C 保存或进行 RT-PCR 扩增。

1.2.2 引物

根据 NCBI GenBank 上已登录的 LMoV 病毒外壳蛋白基因序列设计引物: 5 端引物 L1 为: 5'-TGGGCACCTTGTGAATTAC-3'; 3 端引物 L2 为: 5'-TGCTGTATGCTCTCCGTGC-3'。

1.2.3 RT-PCR 反应体系

反转录体系为 20 μL 。200 μL 试管中加入下列组分: Oligo (dT) 18 ($500\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 μL , total RNA 4 μL , dNTPs Mix ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , ddH₂O 6 μL 。65 °C 水浴 5 min 并迅速置于冰上冰浴, 再加入下列组分: 5 \times First-Strand Buffer 4 μL , Inhibitor (TaKaRa) 1 μL , $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DDT 2 μL 。轻轻混匀后, 42 °C 水浴 2 min。加 1 μL (200 units) SuperScript™ RT, 轻轻混匀, 42 °C 水浴 50 min, 70 °C 15 min。

PCR反应体系为 20 μL , 包括 *Taq* PCR buffer (内含 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$), $200 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs Mix, LMoV上下游引物各 $5 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \mu\text{L}$ dDNA, 1 U *Taq*酶。PCR程序: 95 预变性 4 min, 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, 16 保存, 最后 4 结束反应。

在 9700PCR 仪上进行扩增, 进行琼脂糖 (1.0%) 凝胶电泳, 用 GeDoc1000 凝胶分析仪 (Bio-Rad) 观测电泳结果, 并照相记录。

1.2.4 试验重复与 PCR 扩增产物的测序

在得到阳性扩增后, 全部试验重复 1 次。得到的 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, 在 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 技术进行阳性克隆筛选。

DNA 测序由中国农业科学院重大工程试验室完成, 采用 DNAStar 的 Megalign 程序和聚类法 (clustering method) 将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。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测结果

如图 1 所示, 泳道 1 有一条明显条带与泳道 5 和泳道 7 的条带位置相同, 为检测到的喇叭水仙 ‘Pink-cham’ 阳性材料, 泳道 5 为检测到的百合阳性材料 ‘Sorbonne’ (EU348826), 泳道 7 为阳性对照 (EU348827), 泳道 9 为阴性对照。

重复试验表明, ‘Pink-cham’ 确有相同大小的特异扩增条带, 而其他品种均未扩增出特异条带。经测序比对确定该喇叭水仙中含有马铃薯 Y 病毒属病毒 LMoV。

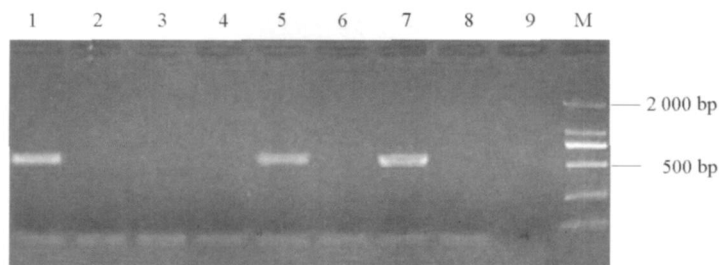


图 1 RT-PCR 检测不同材料 LMoV 结果的琼脂凝胶电泳图

1. 检测到的喇叭水仙 ‘Pink-cham’ 阳性材料; 2. 喇叭水仙 ‘Fortissimo’; 3. 风信子 ‘Woodstock’;
4. 风信子 ‘Fondant’; 5. 百合阳性材料 ‘Sorbonne’; 6. 百合 ‘Tiber’;
7. 百合材料阳性对照; 8. 百合 ‘Siberia’; 9. 阴性对照。

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified products for the detection of LMoV

1. *Narcissus pseudonarcissus* ‘Pink-cham’ tests positive; 2. *Narcissus pseudonarcissus* ‘Fortissimo’;
- 3, 4. *Hyacinthus orientalis* ‘Woodstock’ and ‘Fondant’; 5. Oriental hybrids lily ‘Sorbonne’;
6. Oriental hybrids lily ‘Tiber’; 7. Lily positive control;
8. Oriental hybrids lily ‘Siberia’; 9. Negative control

2.2 序列分析

对特异引物 L1/L2 的扩增产物进行克隆测序, 获得了 ‘Pink-cham’ LMoV 目的片段的核苷酸序列 pink-cham-LMoV, 长度为 553 bp。

将该序列与 GenBank 上已登录的病毒基因序列作 BLAST。分析发现该序列与 6 个百合斑驳病毒

多聚蛋白基因序列 AJ748256、AJ564636、AB053256、AF531458、AJ564637、AJ748257 相似性均在 98% 以上, 与 9 个百合斑驳病毒基因序列 AJ874695、AJ310203、EF158108 (徐榕雪 等, 2007)、AB054886、AM048875、AJ874696、AJ879511、S60810、AY464944 相似性也在 90% 以上。

图 2 为 ‘Pink-charm’ LMov 扩增片段与其它近似病毒分离物核苷酸序列的系统进化树。此外, 将该序列翻译为外壳蛋白的氨基酸序列 (ABW 16938), 图 3 为扩增片段蛋白序列与其它近似病毒分离物蛋白序列比对的系统进化树。从图 3 中也看出它们的相似度非常高, 据此判定待测水仙中确有百合斑驳病毒。该序列已在 GenBank 上登录, 序列号为 EU167936。

除此之外, pink-charm LMov 与郁金香碎色病毒百合株系 (*Tulip breaking virus* lily strain) 多聚蛋白基因序列 S44147 相似性达 95%, 与郁金香带状碎色病毒 (*Tulip band breaking virus*) 序列 AB090385、AB078007、S60805 相似性分别为 91%、89% 和 89%。

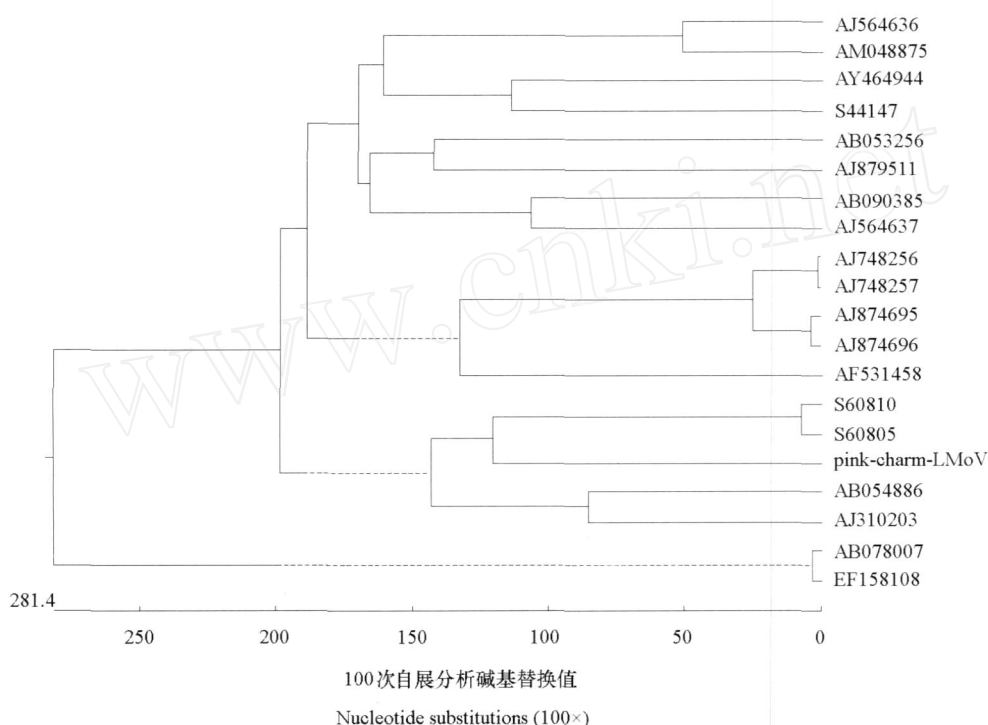


图 2 ‘Pink-charm’ LMov 目的片段序列与其它分离物 LMov 核苷酸序列的系统进化树

AJ748256、AJ564636、AF531458、AJ564637、AJ748257、AJ874695、AJ310203、EF158108、AM048875 和 AJ874696 为百合斑驳病毒中国分离物; AB053256 和 AB054886 为百合斑驳病毒日本分离物; AJ879511 为百合斑驳病毒印度分离物;

AY464944 为百合斑驳病毒韩国分离物; S44147 来自郁金香碎色病毒百合株系;

AB090385、S60805、AB078007 来自郁金香带状碎色病毒;

S60810 为百合斑驳病毒分离物; pink-charm LMov

为试验所得扩增序列。

Fig 2 Phylogenetic dendrogram showing the relationship of nucleotide sequences of pink-charm LMov with others origin LMov

AJ748256, AJ564636, AF531458, AJ564637, AJ748257, AJ874695, AJ310203, EF158108, AM048875 and AJ874696

are isolated from China; AB053256 and AB054886 were isolated from Japan; AJ879511 was isolated from India;

AY464944 was isolated from Korea; S44147 was from *Tulip breaking virus* lily strain;

AB090385, S60805, AB078007 were from *Tulip band breaking virus*;

S60810 was from LMov; pink-charm LMov was

amplified sequence in this experiment

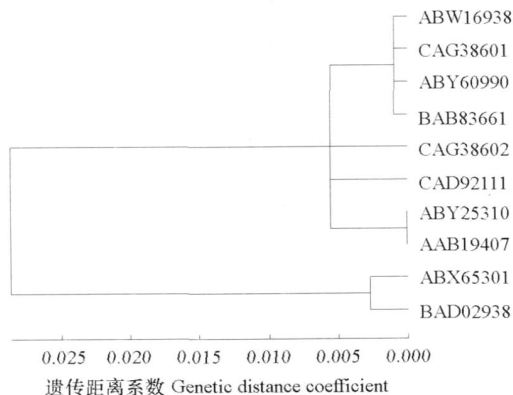


图 3 ‘Pink-cham’ LMoV 目的片段蛋白序列与其它分离物 LMoV 蛋白序列比对的系统进化树

ABY60990、CAG38601、CAG38602、ABY25310 为百合斑驳病毒中国分离物；BAB83661 和 BAD02938 为百合斑驳病毒日本分离物；ABX65301 为百合斑驳病毒韩国分离物；CAD92111 为百合斑驳病毒英国分离物；AAB19407 来自郁金香碎色病毒；ABW16938 为试验所得扩增序列蛋白。

Fig 3 Phylogenetic dendrogram showing the relationship of protein sequences of pink-cham LMoV with others origin LMoV

ABY60990, CAG38601, CAG38602, ABY25310 were isolated from China; BAB83661 and BAD02938 were isolated from Japan; ABX65301 was isolated from Korea; CAD92111 was isolated from United Kingdom; AAB19407 was from *Tulip breaking virus*; ABW16938 was amplified sequence protein in this experiment

3 讨论

目前已报道的水仙病毒有 20 多种（林含新等，1996），以水仙花叶病毒（NMV）和水仙黄条病毒（NYSV）最普遍。本试验从水仙中检测到百合斑驳病毒（LMoV）为首次报道。该病毒单独或与其他病毒复合侵染百合和郁金香时常表现为花瓣颜色斑驳。目前，尚未发现待测喇叭水仙植株花朵颜色明显异常，可能是病毒侵染时期较短，积累量不够，尚未表现斑驳症状，也可能有其他病毒存在对其产生拮抗作用，使之不表现明显受害症状。种植前球的表面有黄褐色斑点，组培球长势受抑制。

通过该病毒测序结果与其它分离物序列的比对可知：该病毒的外壳蛋白基因序列与其它大部分分离物的相似性均在 90% 以上，证明外壳蛋白在病毒的传播和保护病毒 RNA 方面起重要作用且相对保守（徐榕雪等，2007），根据外壳蛋白序列设计引物能检测不同来源的 LMoV。然而，RT-PCR 扩增的特异条带不能完全排除出现假阳性条带的可能，所以本试验通过测序及序列相似性分析，可以有效验证真假阳性。

百合斑驳病毒 *Lily mottle virus* (LMoV) 又名郁金香碎锦病毒百合株系 *Tulip breaking virus lily strain* (TBV 百合株系)，是危害百合的主要病毒之一（丁元明等，2004）。目前国际病毒分类委员会（ICTV）将郁金香带状碎色病毒（TBBV）和百合斑驳病毒（LMoV）暂定为一种病毒（Fauquet et al, 2005）。本试验所得 ‘Pink-cham’ LMoV 目的片段序列与 TBV 百合株系多聚蛋白基因序列 S44147 相似性达 95%，与 TBBV 外壳蛋白基因序列相似性为 91%，与 LMoV 相似性在 89% 以上。根据国际病毒分类委员会（ICTV）第 7 次报告的分类标准，不同 *Potyvirus* 属成员 CP 氨基酸序列同源性应小于 85%，可以确定该分离物为百合斑驳病毒。陈枝楠（1995）利用简并引物 RT-PCR 扩增技术，结合 RT-PCR 扩增片段限制性片段长度多态性（RFLP）分析，对洋水仙 14 个病毒病样品进行分组检测。结果表明洋水仙植物上存在有 4 种以上 PYV 组病毒侵染，它们可能是 TBV、NYSV、NSSV 和 On-

YDV 等, 但未能确定。本研究利用现代分子生物学手段, 应用特异引物克隆到病毒序列并进行了序列分析, 确定了洋水仙上存在 PVY 组成员 LMoV。

本研究通过 RT-PCR 和基因序列分析比较, 对荷兰进口水仙进行带毒情况检测, 检测到百合斑驳病毒, 为以后检测其他来源的 LMoV 提供依据。我国是荷兰球根花卉最大的进口国之一, 2005 年进口各种球超过 1 亿头 (Pieter, 2006)。随着进出口贸易的不断加大, 入境的水仙鳞茎球数量逐年增加, 其携带病毒进入我国的危险也在加大。因此, 需加强病毒检测, 提高检测效率, 以便采取相关措施, 避免对我国水仙造成危害。

References

- Asjes C J. 1976. Virus diseases in *Narcissus* in the Netherlands. *Daffodil*, 8: 3 - 11.
- 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.
- Bos L. 1976. Onion yellow dwarf virus. *CM I/AAB, Description of Plant Viruses*, 158.
- Brunt A A. 1971. *Narcissus* yellow stripe virus. *CM I/AAB, Description of Plant Viruses*, 76.
- Chen Zhi-nan. 1995. The preliminary study on *Narcissus* infected with PVY group viruses by degenerate primer-PCR techniques. *China Virology*, 10 (4): 346 - 350. (in Chinese)
- 陈枝楠. 1995. 简并引物 PCR 技术研究洋水仙 PVY 组病毒初报. *中国病毒学*, 10 (4): 346 - 350.
- Dekker E L, Derks A F L M, Asjes C J. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower breaking. *J Gen Virol*, 74: 881 - 887.
- Ding Yuan-ming, Wang Ji-hua, Liu Zhong-shan, Lu L in. 2004. Detection of lily mottle virus by RT-PCR using special primers and degenerate primers. *Plant Quarantine*, 18 (3): 134 - 137. (in Chinese)
- 丁元明, 王继华, 刘忠善, 陆琳. 2004. 应用特异引物和简并引物检测百合斑驳病毒. *植物检疫*, 18 (3): 134 - 137.
- Fauquet C M, Mayo M A, Manihoff J, Desselberger U, Ball L A. 2005. *Virus taxonomy*. Eighth report of the international committee on the taxonomy of virus. New York: Academic Press: 826 - 827.
- Langeveld S A, Dore J M, Memelink J, Derks A F L M, van der Vlugt C IM, Asjes C J, Bo J F. 1991. Identification of *Potyviruses* using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Gen Virol*, 72: 1531 - 1541.
- Lin Han-xin, Lin Qi-ying, Xie Lian-hui. 1996. *Narcissus* virus disease and its research progress. *Plant Quarantine*, 10 (4): 227 - 229. (in Chinese)
- 林含新, 林奇英, 谢联辉. 1996. 水仙病毒病及其研究进展. *植物检疫*, 10 (4): 227 - 229.
- Liu Wen-hong, Hong Jian, Chen Ji-shuang, Wang Chong, Ye Mei-qin. 2004. Determination and analysis of 3' end genomic sequence of two *Lily mottle virus* isolates occurred in Zhejiang province. *Acta Microbiologica Sinica*, 44 (3): 386 - 389. (in Chinese)
- 刘文洪, 洪健, 陈集双, 王冲, 叶美琴. 2004. 百合斑驳病毒浙江分离物的基因组 3' 端序列分析. *微生物学报*, 44 (3): 386 - 389.
- Pieter Schenk. 2006. Lily development of a global industry. Netherlands. *Plantum NL*: 5 - 18.
- Robertson N L, French R, Gray S M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of lutocovirus. *J Gen Virol*, 72: 1473 - 1477.
- Rosner A, Stein A, Levy S. 1992. Transcription amplification of polymerase chain reaction products of bean yellow mosaic virus RNA extracted from gladioli corms. *Anu Appl Biol*, 121: 269 - 276.
- Shukla D D, Ward C W. 1989. Structures of *Potyvirus* coat protein and its application in the taxonomy of the *Potyvirus* group. *Advances in Virus Res*, 36: 273 - 341.
- van Regenmorte M H V, Fauquet C M, Bishop D H L. 2000. *Virus taxonomy* // Seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses. New York: Academic Press: 10 - 14.
- Xu Rong-xue, Ming Jun, Mu Ding, Liu Chun, Tang Geng-guo, Wang Xiao-wu. 2007. Detection of three lily viruses by multiplex RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 443 - 448. (in Chinese)
- 徐榕雪, 明军, 穆鼎, 刘春, 汤庚国, 王晓武. 2007. 百合三种病毒的多重 RT-PCR 检测. *园艺学报*, 34 (2): 443 - 448.
- Editorial Committee in Ornamental Horticulture Volume of Agricultural Encyclopedia of China. 1996. Ornamental horticulture volume of agricultural encyclopedia of China. Beijing: Agricultural Press: 251 - 252. (in Chinese)
- 中国农业百科全书观赏园艺卷编辑委员会. 1996. 中国农业百科全书观赏园艺卷. 北京: 农业出版社: 251 - 252.
- Zheng H Y, Chen J, Zhao M F. 2003. Occurrence and sequences of *Lily mottle virus* and *Lily symptomless virus* in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China. *Arch Virol*, 148 (12): 2419 - 2428.