

云南鬼针草上发现鬼针草斑驳病毒

王建光¹, 陈海如¹, 苏云松², 孔宝华¹, 范静华¹

¹ 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南省植物病理重点实验室, 云南农业大学, 昆明 650201;

² 云南省玉溪市烟草公司, 云南玉溪 650201)

摘要: 【目的】鉴定侵染鬼针草引起花叶或斑驳的病原。【方法】利用电镜技术观测病原粒子; 间接 ELISA 方法鉴定病原与马铃薯 Y 病毒属病毒的血清学关系; 分子生物学技术克隆了病原 3'-端序列; BLAST, Clustal-X, BioEdit 和 MEGA 4.0 等生物信息学软件用于所得序列的序列分析。【结果】在电镜下可观察到长约 650-700 nm × 13 nm 左右的线状病毒粒子和风轮状内含体; 利用 *Potyvirus* PathoScreen 试剂盒检测呈阳性; 用马铃薯 Y 病毒科病毒筒并引物可扩增获得一条约 1 800 bp 的片段; 序列分析表明该序列与鬼针草斑驳病毒相应序列高度相似, 外壳蛋白的氨基酸同源性及 3'-UTR 核苷酸同源性均达 96% 以上。【结论】侵染云南鬼针草引起花叶或斑驳症状的病原为鬼针草斑驳病毒, 这是该病毒侵染中国鬼针草属植物的首次报道。

关键词: 鬼针草; 马铃薯 Y 病毒属; 鬼针草斑驳病毒

Natural Infection of *Bidens pilosa* L. by *Bidens mottle virus* in Yunnan

WANG Jian-guang¹, CHEN Hai-ru¹, SU Yun-song², KONG Bao-hua¹, FAN Jing-hua¹

¹ Ministry of Education Key Laboratory of Agriculture Biodiversity for Plant Disease Management, The Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; ² Yuxi Tobacco Company of Yunnan Province, Yuxi 653100, Yunnan)

Abstract: 【Objective】 This study was carried out to determine the pathogen causing the mosaic and mottle symptom on *Bidens pilosa* L.. 【Method】 Viral particles in the infected leaves were detected by electron microscopy. Serological relation between the pathogenic virus and genus *Potyvirus* was examined by indirect ELISA. Moreover, the sequence of the 3'-part genome of the virus was cloned by RT-PCR and sequenced by common molecular biological methods. For bioinformational analysis, programs of BLAST at NCBI, Clustal_X, BioEdit and MEGA 4.0 were used for alignment and phylogenetic tree construction. 【Result】 Electron microscopy of leaf dips from infected plants revealed flexuous particles 650-700 nm in length and 13 nm in width. Cytoplasmic lamellar aggregates and pinwheel inclusions were observed in ultrathin sections. Serological reaction between the virus and the antibody of *potyvirus* was positive. A DNA fragment of 1.8 kb with high identity to the sequence of *Bidens mottle virus* (BiMoV) could be amplified through the universal primers of family *Potyviridae* virus. Analysis of the sequence revealed that the amino acid identity of CP and nucleotide identity of 3'UTR to corresponding sequences of BiMoV were both more than 96%. 【Conclusion】 The evidences suggests that the pathogen causing mosaic and mottle symptom on *Bidens pilosa* L. is BiMoV, which is the first report of BiMoV infecting a member of the *Bidens* L. in China.

Key words: *Bidens pilosa* L.; genus *Potyvirus*; *Bidens mottle virus*

0 引言

【研究意义】鬼针草 (*Bidens pilosa* L.) 为一年生

草本植物, 属菊科 (Compositae) 管状花亚科 (Subfam. Carduoideae Kitam.) 向日葵族 (Trib. Heliantheae Cass.) 鬼针草属 (*Bidens* L.), 又称三叶鬼针草, 原产于热

收稿日期: 2008-07-31; 接受日期: 2008-10-14

基金项目: 云南省科技攻关项目 (2006NG02)

作者简介: 王建光 (1976-), 男, 云南曲靖人, 博士研究生, 研究方向为植物病毒学。E-mail: wjg_1979@163.com。通信作者陈海如 (1944-), 男, 云南昆明人, 教授, 研究方向为植物病理学。E-mail: hrchen@mail.ynau.edu.cn

带美洲。鬼针草含有丰富的化学成分^[1-2],是中国民间常用草药^[3-4],同时也是常见的农业杂草^[5],现广泛分布于亚洲和美洲的热带和亚热带地区,在中国主要分布于华东、华中、华南、西南各省区^[3]。在云南省鬼针草主要分布在文山、马关、金平、西双版纳、昆明、富民、镇康、潞西、丽江、德钦等地区^[4]。研究引起鬼针草花叶或斑驳的病原,可为防止其病害向其它农作物传播和防治提供理论依据。【前人研究进展】鬼针草斑驳病毒(*Bidens mottle virus*, BiMoV)和鬼针草花叶病毒(*Bidens mosaic virus*, BiMV)是引起鬼针草花叶或斑驳的两个病毒,这两个病毒虽然早在20世纪60年代就因侵染鬼针草而得名(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.057.0.01.011.htm>),但由于它们具有相同大小的线状病毒粒子、典型的风轮状内含体、相似的血清学关系和相同的寄主,而使得它们与其它相关病毒的分类地位一直难以确定^[6-11]。根据2005年国际病毒分类与命名委员会(ICTV)第八次分类报告,BiMoV是*Potyvirus*属确定成员,BiMV为*Potyvirus*属暂定成员^[12]。但是,随后的研究表明:BiMV应是马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)的一个株系^[8],而中国台湾早期报道侵染向日葵的向日葵黄化斑点病毒(*Sunflower chlorotic spot virus*, SCSV)^[9]应是BiMoV的一个分离物^[13]。【本研究切入点】通过电镜和血清学的方法初步掌握病原物的基本特征,再利用3'-RACE技术,通过RT-PCR获得3'-端基因组序列,并利用生物信息学的方法分析该序列的特征。【拟解决的关键问题】确定引起云南鬼针草花叶或斑驳的病原物,明确与相关病毒(或株系)的亲缘关系和分类地位,并对其分子差异进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

具有花叶、斑驳或畸形症状的鬼针草叶片采自云南昆明,经电镜观察均存在线状病毒粒子,贮存于-80℃待用。Reverse Transcriptase XL (AMV)逆转录酶和*Ex Taq*TM Polymerase购自TaKaRa公司,克隆载体pGEM-T购自Promega公司,PCR产物片段回收采用E.Z.N.A.Gel Extraction Kit (Omega)试剂盒。大肠杆菌*E.coli* DH5 α 为云南省植物病理重点实验室植物病毒研究室保存,其余试剂为国产分析纯。

1.2 病组织电镜观察及血清学反应

具有典型花叶和斑驳症状的感病鬼针草叶片,采用常规负染方法对样品粗汁液进行负染观察,采用

*Potyvirus*属PathoScren诊断试剂盒(Agdia®)进行间接ELISA检测病汁液。

1.3 植物总RNA提取和第一链cDNA合成

总RNA抽提采用Qiagen RNeasy plant Mini Kit,方法参照厂家说明,以M4-T[5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)_{15-3'}]为起始引物^[14],逆转录合成病毒基因组RNA的第一链cDNA,具体方法参照厂家说明。

1.4 PCR扩增、序列克隆和测定

PCR扩增采用*Potyviridae*科简并引物Sprimer [5'-GGXAAAYAAAYAGYGG XCARCC-3'; X=A, G, C或T; Y=T或C; R=A或G]和M4[5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3']引物进行扩增^[14],PCR反应体系参照*Ex Taq*TM Polymersae (TaKaRa)说明,PCR反应程序为:94℃预变性4 min,94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 2 min,经30个循环后72℃延伸7 min。PCR产物经1%(w/v)琼脂糖凝胶电泳分离后切下预期大小条带,通过E.Z.N.A.Gel Extraction Kit (Omega)回收目的片段,纯化产物直接插入pGEM-T载体(Promega),具体方法参照厂家说明。自动测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。序列比对和同源性分析采用Clustal_X^[15]和BioEdit ([Http://www.Mbio.Ncsu.Edu/bioedit/bioedit.html](http://www.Mbio.Ncsu.Edu/bioedit/bioedit.html)),系统进化树分析采用MEGA 4.0软件^[16]。

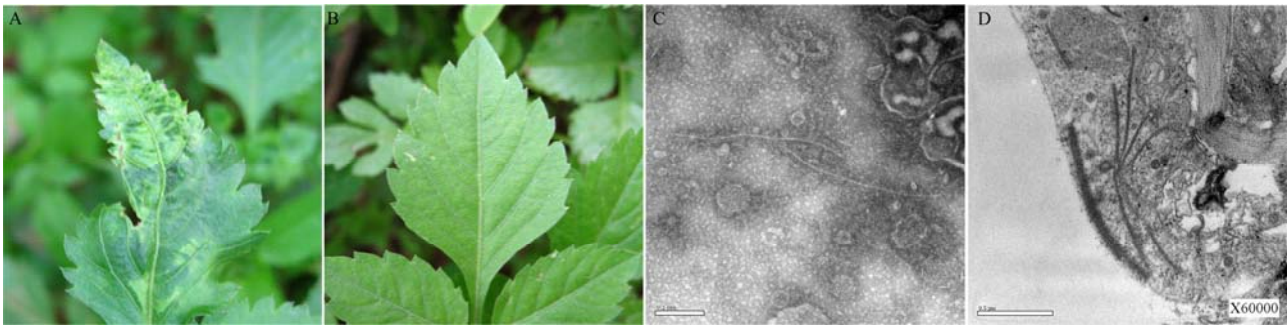
2 结果与分析

2.1 危害症状及病毒粒子形态

受病毒侵染的鬼针草叶片呈现花叶、斑驳和畸形症状(图1),病叶粗汁液或提纯后负染,电镜观察到大量弯曲线状的病毒粒子,长650-700 nm,直径约13 nm,病叶经超薄切片后,电镜观察到具有典型的风轮状内含体产生(图1)。利用*Potyvirus*属PathoScren诊断试剂盒检测病汁液也呈阳性反应,根据病毒粒子的形态和超薄切片结果及血清学反应可初步推测侵染鬼针草引起花叶或斑驳的病原为*Potyvirus*属病毒。

2.2 序列克隆、测定及基因组3'-端序列特征

使用简并引物Sprimer/M4,以病叶总RNA为模板,经RT-PCR扩增获得1800 bp的片段,克隆测序后,获得BiMoV-YN基因组3'-端序列。该序列长1800 nt(不包括Poly(A)尾),GenBank登录号为EU925833。序列中包括部分*Nib*基因C-端序列(从GNNSGQP保守基序编码位点起),完整CP基因和3'-UTR,3'-端具有Poly(A)尾,部分*Nib*基因核苷酸长638 nt(1~638 nt),编码213个氨基酸,CP基因核苷酸全长为



A: 感病叶片; B: 健康叶片; C: 病毒粒子形态, bar=0.2 μm; D: 感病叶片内含体形态, bar=0.5 μm

A: Mottle symptom on infected leaf; B: Health leaf; C: Morphology of viral particles, bar=0.2 μm; D: Morphology of inclusions in infected leaves, bar=0.5 μm

图 1 鬼针草斑驳病症状和病组织电镜观察

Fig. 1 The mottle symptom on *Bidens pilosa* L. and electron micrographs of virus particles in infected leaves

804 nt (639–1442 nt), 编码 268 个氨基酸, 分子量为 30.3 kD。在 4–47 氨基酸位置存在一个 S-G-X₃-T-X₃-N-S-X₃₀-GDD 保守基序, Nib/CP 的裂解位点为 EVHHQ²¹³/A²¹⁴, 且在 221–223 氨基酸位置的 CP 基因 N 端有一个与蚜传相关的 ‘DAG’ 保守基序, 3′-UTR 核苷酸长 354 nt (1 446–1 800 nt)。

2.3 序列同源性及系统进化树分析

在 GenBank/EMBL 中用 BLAST 程序进行同源性搜索表明, 该序列与侵染美国鬼针草的 BiMoV-BA 分离物^[12] (EU078960)、侵染中国台湾向日葵的 BiMoV-SF-1 分离物^[9] (AF538686) 序列同源性最高。采用 Clustal_X 和 BioEdit 软件对所得序列与 BiMoV-BA、BiMoV-SF-1 和相关 *Potyvirus* 属病毒 *Alstroemeria mosaic virus* (AIMV, AB158522)、*Wild potato mosaic virus* (WPMV, AJ437279)、*Amaranthus leaf mottle virus* (AmLMV, AJ580095)、*Lettuce mosaic virus* (LMV, AJ278854) 和 PVY (X12456) 及不同株系 BiMV (AY960150)、*Sunflower chlorotic mottle virus* (SuCMoV, AF255677) 的 CP 基因和 3′非编码区序列同源性分析表明, CP 基因与 BiMoV-BA 和 BiMoV-SF-1 核苷酸序列同源性分别为 97.6% 和 98.7%, 氨基酸序列同源性分别高达 98.8% (仅在 54 (K→E)、65 (V→I) 和 145 (S→P) 位氨基酸发生变化) 和 99.2% (在 53 (T→A), 145 (S→P) 位氨基酸发生变化), 3′-UTR 核苷酸序列同源性为 96.8% 和 99.1%, 与 BiMoV-TSA(EF467235)^[17] 和 BiMoV-AM (EU255631)^[18] 的 Nib 部分序列核苷酸同源性分别为 94.8% 和 95.3%, 氨基酸同源性分别为 97.5% 和 97.0%。与其余 *Potyvirus* 属病毒 (或株系) 的 CP 基因核苷酸、

氨基酸序列同源性分别为 58.5%~68.1% 和 65.0%~72.9%, 3′-UTR 核苷酸序列同源性为 13.1%~54.0%。CP 基因氨基酸序列系统进化树分析表明, 该病毒与 BiMoV-BA 和 BiMoV-SF-1 形成一簇 (图 2)。根据目前 *Potyvirus* 属种的分类标准^[13,19], 侵染云南鬼针草引起花叶或斑驳的病毒是 BiMoV 的一个株系。

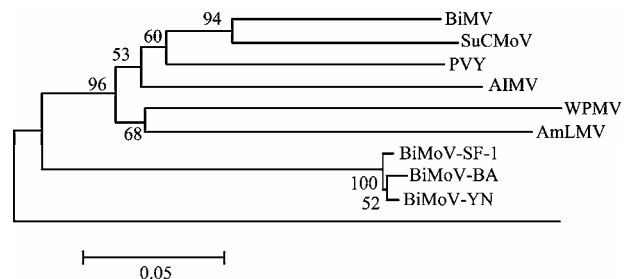


图 2 BiMoV-YN 与 *Potyvirus* 属其它病毒分离物 (或株系) 外壳蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of the coat protein amino acid sequences of BiMoV-YN and other genus *Potyviruses* or strains

3 讨论

本研究获得的 BiMoV-YN 与来源于美国佛罗里达的 3 个 BiMoV-BA, TSA, AM 分离物和来源于台湾的 BiMoV-SF-1 分离物的相应核苷酸序列同源性都 >94.0%, 氨基酸序列同源性 >97.0%。根据 ICTV 和 Adams 的 CP 基因核苷酸同源性 <76% 和氨基酸序列同源性 <80% 的分类标准^[13,19], BiMoV-YN,

BiMoV-BA 和 BiMoV-SF-1 应是同一个病毒的不同分离物。构建的系统进化树研究也表明, BiMoV-YN 与美国报道的 BiMoV-BA 分离物和中国台湾报道的 BiMoV-SF-1 分离物成簇。

BiMoV 除侵染鬼针草外, 还能侵染莴苣、向日葵、蓝羽扁豆、黑心金光菊、百日草属植物、藿香蓟、蚕豆、大阿米芹 (*Ammi majus*) 和 Tropical soda apple (TSA) [6-9,17-18]。鬼针草是中国广泛分布的一类田间杂草, 而莴苣、向日葵和蚕豆等作物又是 BiMoV 的理想寄主, 在中国这些作物是否已受 BiMoV 的侵染仍不清楚, 因此, 对该病毒在中国的分布和危害情况仍需做进一步的调查。

本试验利用 *potyviridae* 科简并引物扩增到的病毒基因组 3'末端片段直接克隆于 T 载体, 选择 12 个阳性克隆进行测序, 序列比较分析没有发现 BiMV, 说明侵染鬼针草的线状病毒是 BiMoV。

尽管 CP 基因序列的分析能提供最多的进化关系信息^[19], 但是, 在 *Potyvirus* 属中, 同一病毒的不同分离物的致病性差异与病毒基因组序列的差异关系比较复杂, 这种差异可能是由于 RNA 自身序列差异或者是其编码蛋白的差异引起的^[20-21]。因此, 笔者将进一步开展该病毒分离物的生物学特性及全基因组序列的测定研究, 以揭示该分离物的特性。

4 结 论

根据病毒粒子的形态、大小和细胞病理学特征以及对 3'-端基因组序列的分析可确定侵染云南鬼针草的线状病毒是 BiMoV, 这是 BiMoV 侵染中国鬼针草的首次报道。系统进化分析显示, 该病毒与中国台湾报道的向日葵分离物 (BiMoV-AF-1) 和美国报道的鬼针草分离物 (BiMoV-BA) 共同形成一簇。

References

- [1] 黄敏珠, 陈海生, 刘建国, 邹晓华, 杜景伶, 项昭保. 中药鬼针草化学成分的研究. 第二军医大学学报, 2006, 27(8): 888-891.
Huang M Z, Chen H S, Liu J G, Zou X H, Du J L, Xiang Z B. Studies on the chemical constituents of *Bidens bipinnata* L.. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2006, 27(8): 888-891. (in Chinese)
- [2] 曹春泉, 孙隆儒. 三叶鬼针草的研究进展. 食品与药品, 2006, 8(12_A): 14-16.
Cao C Q, Sun L R. Research advance in *Bidens pilosa* L.. *Food and Drug*, 2006, 8(12_A): 14-16. (in Chinese)

- [3] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第七十五卷). 北京: 科学出版社, 1979: 369-381.
Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (Tomus 75). Beijing: Science Press, 1979: 369-381. (in Chinese)
- [4] 中国科学院昆明植物研究所编著. 云南植物志, 第十三卷, (种子植物). 北京: 科学出版社, 2004: 287-294.
Institutum Botanicum Kunmingense Academiae Sinicae Edita. *Flora Yunnanica*, Tomus 13, (*Spermatophyta*). Beijing: Science Press, 2004: 287-294. (in Chinese)
- [5] 王岸英, 张玉茹. 菊科 8 种鬼针草属(*Bidens* L.) 杂草种子的鉴别. 吉林农业大学学报, 2002, 24(3): 57-59, 64.
Wang A Y, Zhang Y R. Identification of eight weed seeds of *Bidens* L. in compositae. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2002, 24(3): 57-59, 64. (in Chinese)
- [6] Logan A E, Zettler F W, Christie S R. Susceptibility of *Rudbeckia*, *Zinnia*, *Ageratum*, and other bedding plants to *Bidens mottle virus*. *Plant Disease*, 1984, 68(3): 260-262.
- [7] Baker C A, Raid R N, Scully B T. Natural infection of *Vicia faba* by *Bidens mottle virus* in Florida. *Plant Disease*, 2001, 85(12): 1290.
- [8] Inoue-Nagata A K, Oliveira P A, Dutra L S, Nagata T. *Bidens mosaic virus* is a member of the *potato virus Y* species. *Virus Genes*, 2006, 33: 45-49.
- [9] 廖吉彦, 张清安, 陈金枝, 邓汀钦. 向日葵黄化斑点病毒之分离与鉴定. 植物病理学会刊, 2001, 10: 173-180.
Liao J Y, Zhang Q A, Chen J Z, Deng T Q. Isolation and identification of a virus causing sunflower chlorotic spots in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 2001, 10: 173-180. (in Chinese)
- [10] Dujovny G, Usugi T, Shohara K, Lenardon S. Characterization of a Potyvirus infecting sunflower in Argentina. *Plant Disease*, 1998, 82(5): 470-474.
- [11] Dujovny G, Sasaya T, Koganesawa H, Usugi T, Shohara K, Lenardon S L. Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. *Archives of Virology*, 2000, 145: 2249-2258.
- [12] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [13] Youssef F, Marais A, Candresse T. Partial genome sequence of *Bidens mottle virus* sheds light on its taxonomy. *Archives of Virology*, 2008, 153(1): 227-228.
- [14] Chen J, Chen J, Adams M J. A universal PCR primer to detect members of the *potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 2001,

- 146: 757-766.
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Baker C A, Raid R, Adkins S. *Bidens mottle virus* identified in tropical soda apple in Florida. *Plant Disease*, 2007, 91: 905.
- [18] Baker C A, Roskopf E N, Irely M S, Jones L, Adkins S. *Bidens mottle virus* and *Apium virus Y* identified in *Ammi majus* in Florida. *Plant Disease*, 2008, 92(6): 975.
- [19] Adams M J, Antoniw J F, Fauquet C M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *potyviridae*. *Archives of Virology*, 2005, 150: 459-479.
- [20] Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. And/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 2087-2098.
- [21] Krause-Sakate R, Redondo E, Richard-Forget F, Jadao A S, Houvenaghel M C, German-Retana S, Pavan M A, Candresse T, Zerbini F M, Gall O L. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*, 2005, 109: 175-180.

(责任编辑 毕京翠)