

侵染我国芋的杆状 DNA 病毒分子鉴定及特异性检测

施世明^{1#}, 王彦芬^{1#}, 王国平^{1,2}, 王利平¹, 徐文兴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:采用已报道杆状 DNA 病毒属 (*Badnavirus*) 的通用检测引物 BadnaFP/BadnaRP, 从 7 份芋样品中扩增到 *Badnavirus* 病毒的 RT/RNase H 基因保守区域, 获得 12 个克隆序列, 长度为 576 bp。序列分析结果显示, 来自不同样品的克隆间核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 78.8%~99.5% 和 81.3%~99.5%; 来自同一样品扩增产物的克隆间在序列上也存在较大差异, 核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 89.6%~100% 和 92.7%~100%。在系统进化树中, 本研究所获序列与 *Badnavirus* 病毒的亲缘关系相对较近, 聚在同一簇, 表明此病毒为 *Badnavirus* 属病毒, 但与芋杆状病毒 (*Taro bacilliform virus*, TaBV) 序列相似性较低, 核苷酸和氨基酸相似性分别为 58.0%~62.2% 和 58.5%~64.1%, 推测为杆状 DNA 病毒属的一个新种。根据所测定序列设计了用于该病毒检测的引物 P197/P433, 对 51 份芋样品检测结果表明, 该引物可有效检测来源于我国芋的 *Badnavirus* 病毒。

关键词: 芋; 杆状 DNA 病毒; PCR; 序列分析

Molecular identification and specific detection of *Badnavirus* from taro grown in

China SHI Shi-ming^{1#}, WANG Yan-fen^{1#}, WANG Guo-ping^{1,2}, WANG Li-ping¹, XU Wen-xing¹,

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

Abstract: The universal degenerate primers BadnaFP/BadnaRP were used for the detection of badnaviruses in taro grown in China. The target fragment of 576 bp, covering the conserved region of genes encoding reverse transcriptase (RT) and ribonuclease H (RNase H), was amplified from seven samples. Sequence analysis of 12 clones of PCR products from those samples showed that the clones from different samples had similarities of 78.8%–99.5% and 81.3%–99.5% at nucleotide (nt) and amino acid (aa) levels, and the clones from the same sample had similarities of 89.6%–100% and 92.7%–100% at nt and aa levels, respectively. Phylogenetic analysis revealed that all the isolates belonged to a member of *Badnavirus*. However, the obtained sequences shared only 58.0%–62.2% nt and 58.5%–64.1% aa similarities with sequences of *Taro bacilliform virus*, suggesting that it might be a new tentative species in the genus *Badnavirus*. Primers P197/P433 based on the obtained sequences were used for detecting this virus from 51 taro samples. The results showed that the designed primers could be used for effective and specific detection of the badnaviruses in taro grown in China.

Key words: taro; *Badnavirus*; PCR; sequence analysis

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)06-0590-06

收稿日期: 2013-01-17; 修回日期: 2013-09-18

基金项目: 国家农业行业专项计划 (nyhyzx200903017-08)

通讯作者: 洪霓, 教授, 主要从事植物病毒学研究; E-mail: whni@mail.hzau.edu.cn

共同第一作者: 施世明, 男, 湖北省武汉人, 硕士, 研究方向为植物病毒学; E-mail: 358287247@163.com;

王彦芬, 女, 河南省濮阳人, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒学; E-mail: wyfhist@163.com。

芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] 是天南星科 (Araceae) 芋属 (*Colocasia*) 多年生宿根草本植物, 在长期的无性繁殖过程中, 病毒不断积累而加重危害, 导致芋产量和品质下降^[1,2]。Yang 等^[3]报道巴布亚新几内亚等太平洋岛国种植的芋上广泛分布着一种杆状 DNA 病毒, 命名为芋杆状病毒 (*Taro bacilliform virus*, TaBV)。TaBV 为花椰菜花叶病毒科 (*Caulimoviridae*) 杆状 DNA 病毒属 (*Badnavirus*) 成员^[3-5]。目前 *Badnavirus* 有 18 个正式种和 12 个暂定种^[6], 代表种是鸭跖草黄斑驳病毒 (*Commelina yellow mottle virus*, ComYMV)。该属病毒的基因组为单分子不完全环状双链 DNA (Double stranded DNA, dsDNA), 大小为 7.5 kb~8.0 kb, 含有 3~7 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF)。基因组的逆转录酶 (RT) 和 RNA 酶 H (RNase H) 编码区相对保守, 其序列特征可用于该属各病毒种的鉴定^[7-10]。TaBV 的基因组序列全长为 7 458 bp, 正义链包含 4 个 ORF, 已有研究表明该病毒存在高度分子变异^[11-13], 不仅使该病毒在生物学和血清学上具有多样性, 也导致常规 PCR 检测技术的检测效果不稳定。

我国芋产业发展迅速, 芋病毒病的危害已引起人们的高度重视, 但相关研究仍较薄弱。本研究通过收集田间表现病毒病症状的芋样品, 进行了杆状 DNA 病毒分子鉴定和 PCR 检测的改进, 研究结果对深入了解芋杆状 DNA 病毒的分子特性提供了有用信息, 同时为芋无病毒种质培育提供了有效的病毒检测技术。

1 材料与方法

1.1 供试材料

从湖北武汉、黄石、仙桃和山东临沂共采集芋叶片样品 51 份, 多数采样植株的叶片表现花叶或羽状斑驳等症状。

1.2 总核酸的提取

取待检材料嫩叶 0.1 g, 加液氮研磨成粉状, 快速转入 2 mL 离心管中, 加入 800 μ L 1.5% CTAB 提取缓冲液, 剧烈混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后离心, 上清液经氯仿抽提 2 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 50 μ L 无菌水, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 引物设计与合成

用于扩增杆状 DNA 病毒部分 RT 和 RNase H 基因的引物为 *Badnavirus* 属通用引物 BadnaFP/BadnaRP: ATGCCITTYGGIAARAAYGCICC/CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC^[3]。

根据本研究所获得的杆状 DNA 病毒 RT/RNase H 基因保守序列设计了该病毒的检测引物 P197/P433: TGAAAATHGCRGTACCAWCCAT/RGCCARTCYTGTTKRTTCAT (H = A/C/T, R = A/G, W = A/T, Y = C/T, K = G/T)。引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4 PCR

以提取的芋叶片总核酸为模板, PCR 反应总体积为 25 μ L, 含 10 \times PCR 溶液 2.5 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) (宝生物工程(大连)有限公司) 0.2 μ L、正向和反向引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L)、总核酸 1 μ L 和灭菌的去离子水 19.8 μ L。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C (引物 BadnaFP/BadnaRP) 和 55 $^{\circ}$ C (引物 P197/P433) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳后在 EB 中染色 10 min, 将其置于凝胶成像系统上观察并记录结果。

1.5 扩增产物克隆及测序

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 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) 说明回收目标 DNA, 连接至 pMD18-T 载体 (宝生物工程(大连)有限公司), 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株感受态细胞后, 涂布在含 100 mg/L 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 的 LB 固体培养基上, 待菌落长出后随机挑取一定数量的白色单菌落, 在含 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中振荡培养, 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。

1.6 序列分析

序列比对采用生物学软件 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, NJ) 进行。采用已报道的花椰菜花叶病毒科的 6 属病毒参照序列见表 1。

Table 1 Sequences of members in the family *Caulimoviridae* used for phylogenetic analysis

Genus	Species	Acronym	Accession no.
<i>Caulimovirus</i>	<i>Carnation etched ring virus</i>	CERV	NC003498
	<i>Dahlia mosaic virus</i>	DaMV	AY309479
	<i>Figwort mosaic virus</i>	FMV	NC003554
	<i>Horseradish latent virus</i>	HRLV	AY534732
	<i>Mirabilis mosaic virus</i>	MiMV	AF454635
	<i>Strawberry vein banding virus</i>	SVBV	NC001725
<i>Petuvirus</i>	<i>Petunia vein clearing virus</i>	PVCV	NC001839
<i>Soymovirus</i>	<i>Blueberry red ringspot virus</i>	BRRSV	AF404509
	<i>Peanut chlorotic streak virus</i>	PCSV	NC001634
	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	SbCMV	X15828.2
<i>Cavemovirus</i>	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	TVCV	AF190123
	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	CsVMV	U20341
<i>Tungrovirus</i>	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	RTBV	AF220561
<i>Badnavirus</i>	<i>Banana streak virus</i> *	BSV	FJ594910
	<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	SCBV	FJ824814
	<i>Piper yellow mottle virus</i>	PYMV	DQ836237
	<i>Taro bacilliform virus</i>	TaBV	AY186615
	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	DBV	AM503402

* * : The name of the virus has been revised in the latest taxonomy report. The sequence referred is mostly similar to *Banana streak OL virus* (AJ002234).

2 结果与分析

2.1 杆状 DNA 病毒的 RT/RNase H 基因分子鉴定

所采集芋样品中随机取 26 份样品,以所提取总核酸为模板,用 *Badnavirus* 属病毒通用引物 BadnaFP/BadnaRP 进行 PCR 扩增,其中 13 份样品获得了预期大小的扩增条带,同时存在 2~3 条非目标条带(图略),对目标产物进行回收纯化、克隆和测序,来自每个样品的测序克隆数为 1~3 个,结果显示来自湖北武汉蔬菜所 7 个样品的扩增片段为 *Badnavirus* 病毒 RT/RNase H 基因保守区,共获得 12 个克隆的序列(表 2),经测序可得目标片段大小均为 576 bp。序列比对结果显示,来自不同样品的克隆间核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 78.8%~99.5% 和 81.3%~99.5%;来自同一样品(样品 T-2 和 T-4)扩增产物的克隆间在序列上也存在较大差异,核苷酸和氨基酸序列相似性分别为

89.6%~100% 和 92.7%~100%。

本研究所获得的病毒序列与 NCBI 上登录的 *Badnavirus* 属病毒序列相似性相对较高,与我国报道的登录号为 FJ594910 的 BSV 相似性最高,核苷酸和氨基酸相似性分别为 70.3%~74.1% 和 72.9%~77.0%;与报道的巴布亚新几内亚芋上分离的 TaBV (登录号:AF357836)核苷酸和氨基酸相似性分别为 58.0%~62.2% 和 58.5%~64.1%。

对本研究所获序列与花椰菜花叶病毒科的 6 属代表病毒种的序列(表 1)进行系统进化分析,结果显示,所获得病毒序列与 *Badnavirus* 属的 PYMV、BSV、DBV、SCBV 和 TaBV 亲缘关系相对较近,在系统进化树中聚在一簇,与其他属的病毒亲缘关系较远(图 1),表明此病毒为 *Badnavirus* 属病毒。而在 *Badnavirus* 病毒中,来自我国芋上的 RT/RNase H 基因序列与已报道的该属病毒相应序列存在较大差异,单独聚为一个亚簇。

Table 2 Percent nucleotide (below diagonal) and amino acid identities (above diagonal) of RT/ RNase H genes of a badnavirus obtained from taro plants grown in China

Isolate	T-1	T-2-1	T-2-2	T-2-3	T-3	T-4-1	T-4-2	T-4-3	T-5	T-6-1	T-6-2	T-7
T-1	--	96.3	93.2	93.2	93.7	96.9	99.5	99.5	83.8	95.3	95.3	83.8
T-2-1	91.0	--	94.8	92.7	93.2	98.4	96.9	96.9	82.3	94.8	94.8	83.3
T-2-2	89.2	89.9	--	97.9	95.3	94.3	93.7	93.8	81.8	96.9	96.9	82.8
T-2-3	88.5	89.6	98.6	--	94.3	93.2	92.7	92.7	81.8	95.8	95.8	81.8
T-3	89.2	87.0	93.1	92.4	--	92.7	94.2	94.3	81.3	96.4	96.4	82.3
T-4-1	91.1	99.5	89.8	89.8	86.8	--	96.3	96.4	83.3	94.3	94.3	83.3
T-4-2	97.7	91.7	89.9	89.2	90.5	91.5	--	100.0	83.2	95.8	95.8	84.3
T-4-3	98.1	92.0	90.3	89.6	90.5	91.8	99.7	--	83.3	95.8	95.8	84.4
T-5	81.1	81.8	80.2	79.7	78.8	81.9	80.4	80.7	--	81.8	81.8	99.0
T-6-1	88.5	88.5	92.9	92.2	92.2	88.4	88.7	89.1	80.0	--	100.0	82.8
T-6-2	88.5	88.5	92.9	92.2	92.2	88.4	88.7	89.1	80.0	100.0	--	82.8
T-7	80.9	82.3	80.4	79.9	79.3	82.1	80.9	81.3	99.5	80.6	80.6	--

Note: Sample ID followed by clone number.

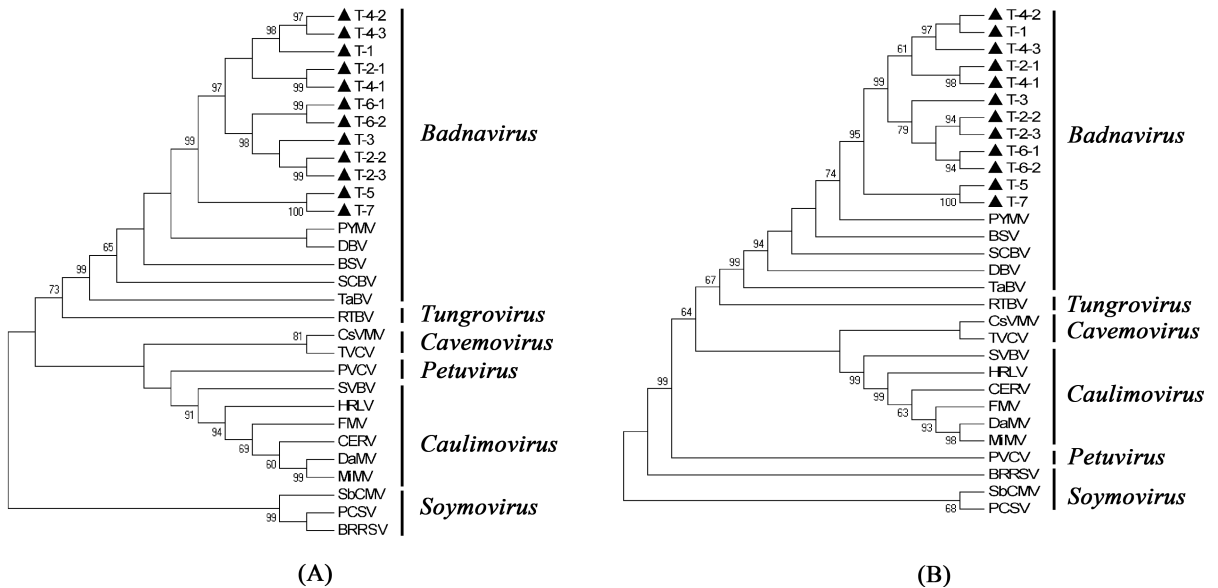


Fig. 1 Neighbor joining phylogenetic trees of partial nucleotide(A) and amino acid(B) sequences of the RT/ RNase H genes of the *Badnavirus* isolates obtained in this study and viruses in different genus of the family *Caulimoviridae*

“▲”: Indicated the isolates sequenced in this study.

2.2 来源于芋的杆状 DNA 病毒的 PCR 检测

根据所获得的来源于我国芋的 *Badnavirus* 病毒 RT/RNase H 基因的部分保守区域序列设计了该病毒的特异性检测引物 P197/P433, 结合位点为

引物 BadnaFP/BadnaRP 扩增所获 576 bp 片段的 196~217 bp 和 432~452 bp。采用引物 P197/P433 对采自湖北和山东的 51 份样品进行了 PCR 检测(图2), 从38份样品中扩增到257 bp 的目标

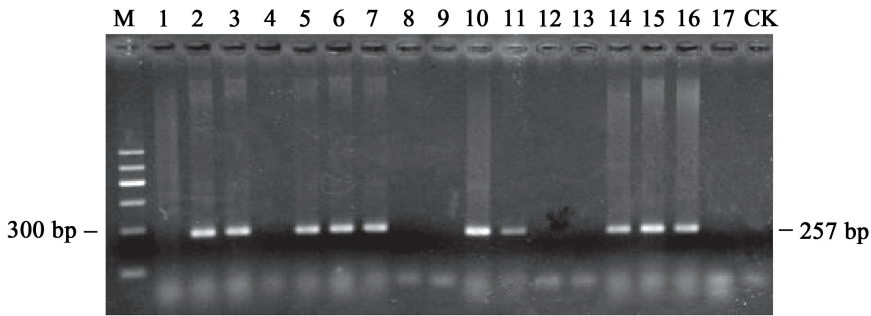


Fig. 2 1.2% agarose gel electrophoresis of PCR products of badnavirus-like virus from some taro plants

Lane M: DNA Marker II; Lane 1-17: Taro samples; CK: Negative control.

产物,且目标产物的电泳条带单一,无非特异性条带,检出率为 74.5%。其中来自武汉蔬菜所的 10 个样品中 8 个扩增结果为阳性,较引物 *BadnaFP/BadnaRP* 扩增效率高 10%;而其他来源的样品的扩增阳性率达 50%~100%(表 3)。对来自部分样品的目标片段进行回收克隆测序,序列分析表明所获扩增片段为杆状 DNA 病毒 RT/RNase H 基因的保守序列。

3 结论与讨论

本研究首次从中国大陆的芋头上检测到一种杆状 DNA 病毒,对其 RT/RNase H 基因序列进行分析的结果显示,该病毒的 RT/RNase H 基因核苷酸和氨基酸序列在系统进化树中均与花椰菜花叶病毒科的 *Badnavirus* 属的病毒聚在一簇,确认其为 *Badnavirus* 属病毒。同时发现来自我国种植芋的杆状 DNA 病毒的 RT/RNase H 基因的核苷酸和氨基酸序列相似性较高,而与已报道病毒的 *Badna-*

virus 属各病毒的核苷酸及氨基酸序列相似性均低于 80%,并形成独立的一个亚簇。RT/RNase H 基因为 *Badnavirus* 属病毒的保守基因^[3,7-10],根据国际病毒分类委员会有关 *Badnavirus* 属不同种的划分标准,即不同种的 RT/RNase H 序列差异大于 20%^[6],结合本研究所获得序列的系统进化关系,以及与已知 *Badnavirus* 属的各病毒序列比较结果,推测此病毒可能为 *Badnavirus* 属的一个新种。有关该病毒的起源、生物学和分子特性及分类地位等,还有待深入研究。

采用简并引物对来自我国种植芋的杆状 DNA 病毒的 RT/RNase H 基因扩增及序列分析结果显示,所用引物扩增效率较低,且存在非特异性条带,在 13 份具有目标产物的样品中仅有 7 份样品的扩增产物来自 DNA 病毒的 RT/RNase H 基因,由于该病毒序列与已报道序列存在较大变异,已报道的引物^[11]不适合来源于我国芋的该病毒的检测。而所设计的针对本研究所分析病毒设计的检测引物,

Table 3 PCR results for the detection of a badnavirus in taro collected from different fields

Sample sources	Sample ID	No. of detected samples	No. of positive samples	Frequency/%
Hubei Caidian Majiadu	MJD	5	5	100.0
Hubei Xiantao	XT	8	5	62.5
Huazhong Agricultural University	HN	4	2	50.0
Wuhan Vegetable Research Institute	SCS	10	8	80.0
Hubei Huangshi	HS	21	15	71.4
Shandong Linyi	LY	3	3	100.0
Total		51	38	74.5

具有特性高、检测效果稳定的特点,可用于我国种植芋的杆状 DNA 病毒的批量检测。

参考文献

- [1] Gollifer D E, Brown J F. Virus diseases of *Colocasia esculenta* in the British Solomon Islands [J]. Plant Disease Report, 1972, 56: 597-599.
- [2] Jackson G V H, Gollifer D E. Disease and pest problems of taro (*Colocasia esculenta*(L.) Schott) in the British Solomon Islands [J]. Pest Articles and News Summaries, 1975, 21: 45-53.
- [3] Yang I C, Hafner G J, Revill P A, et al. Genomic characterisation of *Taro bacilliform virus* [J]. Archives of Virology, 2003a, 148: 937-949.
- [4] Gollifer D E, Jackson G V H, Dabek A J, et al. The occurrence and transmission of viruses of edible aroids in the Solomon Islands and the Southwest Pacific [J]. Pest Articles and News Summaries, 1977, 23: 171-177.
- [5] James M, Kenten R H, Woods R D. Virus-like particles associated with two diseases of *Colocasia esculenta* (L.) Schott in the British Solomon Islands [J]. Journal of General Virology, 1973, 21: 145-153.
- [6] King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. 429-443.
- [7] Harper G, Julian O, Harrison H, et al. Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* Genome: molecular and cytogenetic evidence [J]. Virology, 1999, 255: 207-213.
- [8] Philippe G, Marie L. Phylogeny of *Banana streak virus* reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its banana host (*Musa* sp.) [J]. Journal of Molecular Evolution, 2009, 69: 65-80.
- [9] Zettler F W, Foxe M J, Hartman R D, et al. Filamentous viruses infecting Dasheen and other Araceous plants [J]. Phytopathology, 1970, 60: 983-987.
- [10] Andrew D W G, Neil E O, Glyn H, et al. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses [J]. Journal of General Virology, 2005, 86: 511-520.
- [11] Yang I C, Hafner G J, Revill P A, et al. Sequence diversity of South Pacific isolates of *Taro bacilliform virus* and the development of a PCR-based diagnostic test [J]. Archives of Virology, 2003b, 148: 1957-1968.
- [12] Geering A D W, McMichael L A, Dietzgen R G, et al. Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia [J]. Phytopathology, 2000, 90: 921-927.
- [13] Braithwaite K S, Egeskov N M, Smith G R. Detection of *Sugarcane bacilliform virus* using the polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 1995, 79: 792-796.

责任编辑:于金枝