

研究简报

Research Notes

侵染芹菜的甜椒内源 RNA 病毒鉴定及序列分析

赵兴华¹, 于沛侠², 陈丽君², 王德富², 牛颜冰^{2*}

(1. 河南省济源市农牧局园艺工作站, 济源 459000; 2. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801)

摘要 本试验利用双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)提取技术和非序列依赖 PCR 扩增(sequence-independent amplification, SIA)方法对表现皱缩症状的芹菜进行分子鉴定,发现芹菜被甜椒内源 RNA 病毒 *Bell pepper alphaendornavirus* (BPEV) 所侵染。为进一步明确山西芹菜 BPEV 分离物 (BPEV-QC, GenBank 登录号为 KY659226) 的分类地位,根据 SIA 测序结果设计 BPEV 特异性引物进行 RT-PCR 检测,并进行序列相似性比较和系统进化分析。序列同源性分析表明:BPEV-QC 与 BPEV 分离物 (IS, Maor, Kyosuzu, BPEV, lj, BPEV-YW) 的同源性为 80.0%~97.8%,与其他内源 RNA 病毒科分离物的同源性仅为 30.6%~37.6%,表明:BPEV-QC 与 BPEV 分离物 (IS, Maor, Kyosuzu, BPEV, lj) 形成一个独立分支,亲缘关系最近。

关键词 芹菜; 病原鉴定; 甜椒内源 RNA 病毒; 序列分析

中图分类号: S 436.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.023

Detection and sequence analysis of *Bell pepper alphaendornavirus* infecting *Apium graveolens*

Zhao Xinghua¹, Yu Peixia², Chen Lijun², Wang Defu², Niu Yanbing²

(1. Horticultural Station of Jiyuan Agricultural and Animal Husbandry Bureau in Henan Province, Jiyuan 459000, China;

2. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract Viral pathogen that caused *Apium graveolens* wrinkled disease, was identified by double-stranded RNA (dsRNA) extraction and sequence-independent amplification (SIA). The results of SIA and sequencing showed that *A. graveolens* was infected by *Bell pepper alphaendornavirus* (BPEV). To further characterize the BPEV strain from *A. graveolens* (BPEV-QC), specific primer pairs were designed for RT-PCR according to the results of SIA. Sequence alignments showed that BPEV-QC shared high homology (80.0% - 97.8%) with BPEV isolates (IS, Maor, Kyosuzu, BPEV, lj, BPEV-YW), but shared low homology (30.6% - 37.6%) with other *Endornaviridae* isolates. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of BPEV-QC and other *Endornaviridae* isolates showed that BPEV-QC was most closely related to *Endornaviridae* isolates (IS, Maor, Kyosuzu, BPEV, lj), and these isolates formed an independent branch.

Key words *Apium graveolens*; pathogen identification; *Bell pepper alphaendornavirus*; sequence analysis

芹菜 *Apium graveolens* 为伞形科植物,具有一定的药用功效。近年来,随着人们生活水平的提高和保健意识的增强,对芹菜的需求量也在不断增加,种植规模不断扩大引起的病毒病危害也愈发普遍,严重影响了芹菜的产量和品质。目前芹菜主要受到黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)^[1]、烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、蚕豆萎蔫病毒 Broad

bean wilt virus (BBWV)、欧洲防风花叶病毒 *Parsnip mosaic virus* (ParMV)^[2]、芹菜花叶病毒 *Celery mosaic virus* (CeMV)^[3]、苜蓿花叶病毒 *Alfalfa mosaic virus* (AMV)^[4]、花生矮化病毒 *Peanut stunt virus* (PSV)、南芥菜花叶病毒 *Arabis mosaic virus* (ArMV)、草莓潜环斑病毒 *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)、番茄不孕病毒 *Tomato*

收稿日期: 2016-10-25 修订日期: 2017-01-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303028); 国家自然科学基金(31540050)

* 通信作者 E-mail: niuyanbingbest@163.com

aspermy virus (TAV)^[5]、芹菜黄花叶病毒 *Celery yellow mosaic virus* (CeYMV) 和芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic virus* (TuMV) 等病毒的单独或复合侵染。

笔者于 2014 年 9 月对山西晋中地区芹菜进行病害调查时,发现许多芹菜植株表现出严重皱缩症状,有的田块病株率甚至高达 60%。为明确引起芹菜皱缩症状的病原,本试验利用 dsRNA 技术^[6] 和 SIA 方法^[7] 对采集的疑似病毒病样品进行分子鉴定,结果发现芹菜受到 BPEV 侵染,将其命名为 BPEV-QC,并对 BPEV-QC 的部分序列进行了克隆和系统进化分析,明确了其分类地位,这为进一步获得甜椒内源 RNA 病毒山西芹菜分离物(BPEV-QC)的基因组全序列奠定了一定的基础,也为芹菜病毒病的防治工作提供了参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

表现皱缩症状的芹菜植株叶片病样采自山西太谷韩村(图 1)。



图 1 芹菜田间发病症状

Fig. 1 Symptoms of diseased *Apium graveolens* in the field

1.2 方 法

1.2.1 植物病原 dsRNA 的提取

参照牛颜冰等^[8-9] 和 Tzanetakis 等^[6] 的方法提取表现皱缩症状的芹菜病叶 dsRNA。

1.2.2 样品 SIA 和 RT-PCR 检测

以提取的病样 dsRNA 为模板,用 XTN269 引物反转录获得病毒 cDNA,再利用 XTN177 引物进

行 SIA 检测,反应体系和程序参照牛颜冰等^[10] 的方法。明确芹菜病毒病原后,根据 NCBI 上已收录的 BPEV 分离物保守区设计特异引物对病毒部分序列进行 RT-PCR 扩增,同时以健康植株为阴性对照。所使用的随机引物序列与特异引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Sequences of primer pairs used for SIA and RT-PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
XTN269	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGNNNNNN
XTN177	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
BPEV-F	TGGTCACGAAACGGTATTGA
BPEV-R	TTTGTAGCAAGGGGTGCTCT

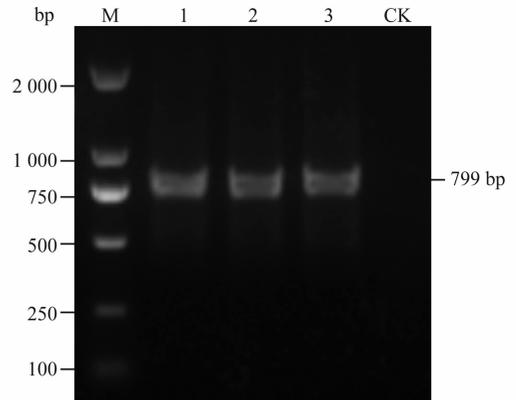
1.2.3 PCR 产物克隆及序列分析

PCR 产物纯化回收后进行连接和转化,随机选取 3 个经菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆进行测序。测序结果利用 NCBI 中的 BLAST 检索同源序列;序列相似性采用 DNAMAN 6.0 软件进行分析;利用 MEGA 5.2 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 样品 SIA 检测结果

以 XTN177 为引物,以反转录得到的 cDNA 为模板进行 SIA 扩增,得到大小为 799 bp 的片段,而健康样品未扩增出相应大小的条带(图 2)。测序结果经 BLAST 同源性比较发现其与已报道的 BPEV 分离物的相似性最高,为 80.0%~97.8%,初步证明芹菜被 BPEV 所侵染,并将其命名为 BPEV-QC。



M: DL2000 DNA Marker; 1~3: 感病植株; 4: 健康植株
M: DL2000 DNA Marker; 1-3: Infected plant; 4: Healthy plant

图 2 芹菜病样 SIA 扩增产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of SIA products of diseased *Apium graveolens* leaves

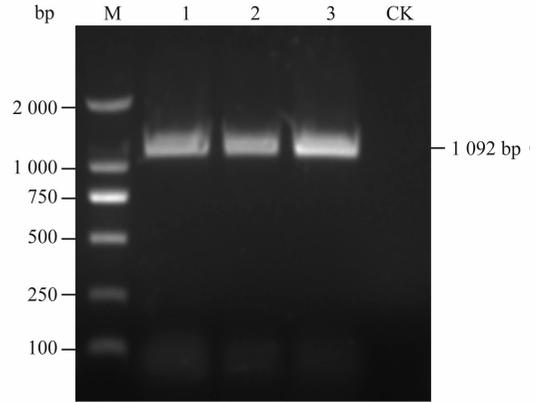
2.2 样品 RT-PCR 检测

为进一步确定侵染芹菜的病毒病原,以 cDNA 为模板,以 BPEV-F/BPEV-R 为引物进行特异性扩增,获得大小为 1 092 bp 的目的片段(图 3),而健康样品中未扩增出相应大小的片段,说明引起芹菜皱缩症状的病毒为 BPEV。

2.3 BPEV-QC 与内源 RNA 病毒科其他分离物的序列相似性

利用 DNAMAN 6.0 软件对 BPEV-QC 分离物和其他 13 个内源 RNA 病毒科分离物(表 2)进行核苷酸序列同源性分析,结果表明分离物 BPEV-QC 与其他内源 RNA 病毒分离物的核苷酸同源性在 30.6%~97.8% 之间,其中与 BPEV 分离物 IS、Maor、Kyosuzu、BPEV、lj、BPEV-YW 的同源性较高,在 80.0%~97.8% 之间,与来自以色列 IS 的同源性最高,为 97.8%,与来自美国的 BPEV-YW 同源

性最低,为 80.0%,而与其他内源 RNA 病毒科分离物同源性比较低,为 30.6%~37.6%。



M: DL2000 DNA Marker; CK: 健康植株; 1~3: 感病植株
M: DL2000 DNA Marker; CK: Healthy plant; 1~3: Infected plant

图 3 芹菜病样 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Electrophoresis of RT-PCR products of *Apium graveolens* leaves

表 2 BPEV-QC 与已报道的 13 个内源 RNA 病毒分离物核苷酸同源性比较¹⁾

Table 2 Percentage of nucleotide identities between BPEV-QC and other 13 reported *Endornaviridae* isolates

株系或分离物 Strain or isolate	GenBank 登录号 GenBank accession no.	来源 Origin	核苷酸序列同源性 / % Homology of nucleotide sequence	宿主 Host
IS	JQ951943	以色列	97.8	辣椒
Maor	KP455654	韩国	97.7	辣椒
Kyosuzu	AB597230	日本	97.7	辣椒
BPEV	KT149366	加拿大	97.3	辣椒
lj	KF709944	中国	96.1	辣椒
BPEV-YW	JN019858	美国	80.0	辣椒
CS	KR080326	韩国	62.0	辣椒
HmEV-1	NC_013447	—	33.4	—
OrEV	NC_007649	—	37.6	野生稻
OsEV	NC_007647	—	36.2	水稻
PEV-1	NC_007069	美国	34.3	冷杉
PaEV	JN880414	西班牙	35.6	鳄梨
VIEV	NC_007648	—	30.6	蚕豆

1) “—”表示未知。
“—” unknown.

2.4 BPEV-QC 系统进化分析

为进一步明确 BPEV-QC 的起源与进化关系,使用 MAGE 5.2 软件对该分离物和已报道的其他 13 个来源不同的内源 RNA 病毒科分离物构建系统进化树(图 4)。从系统进化树中可以看出,BPEV-QC 与其他 BPEV 分离物 (IS、Maor、Kyosuzu、BPEV、lj) 形成一个大的分支,聚为一簇,这进一步说明 BPEV-QC 属于 BPEV 分离物。

3 讨论

植物病毒素称植物“癌症”,作为伞形科蔬菜的

主要病害之一,常常导致芹菜产量降低和品质变劣。笔者 2014 年对山西晋中地区芹菜进行病害调查时发现田间病毒病害发生较为普遍,部分田块病株率甚至高达 70%。为明确其具体病毒病原,本研究利用双链 RNA 技术和 SIA 检测方法对芹菜病株进行了分子鉴定,发现感病芹菜受到甜椒内源 RNA 病毒的侵染,该结果为芹菜病毒病害的有效防治提供了一定的依据。

内源 RNA 病毒自第一次从蚕豆中发现以来,其寄主范围在不断扩大,包括植物^[11]、真菌^[12]和卵菌等。内源 RNA 病毒的基因组大小在 9.8~17.6 kb

之间^[13-14],能独立于宿主的基因进行复制^[15]。内源 RNA 病毒属 *Endornavirus* 是国际病毒分类委员会 (ICTV) 于 2005 年 7 月第八次病毒分类报告中新增的属,其代表种是蚕豆内源 RNA 病毒^[16-17],2012 年第九次病毒分类报告中将其升级为内源 RNA 病毒科 *Endornaviridae*^[18],2016 年国际病毒分类委员会又将 *Endornaviridae* 划分为 *Alphaendornavirus* 和 *Betaendornavirus* 两个属 (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>)。甜椒内源 RNA 病毒是 *Alphaendornavirus* 属的一个重要成员,其编码的蛋白从 N 端到 C 端依次为病毒的甲基转移酶、解旋酶、UDP-糖基转移酶和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶^[19]。

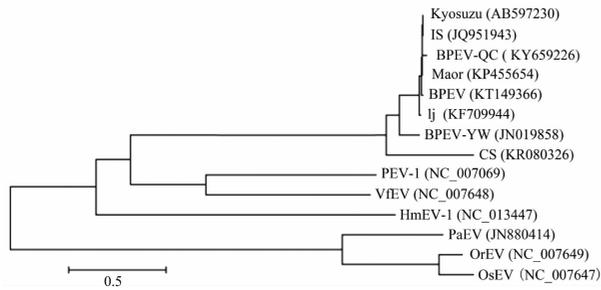


图 4 BPEV-QC 与已报道的其他 13 个内源 RNA 病毒分离物系统进化树构建

Fig. 4 Phylogenetic tree of BPEV-QC and other 13 reported *Endornaviridae* isolates

大多数内源 RNA 病毒对宿主不引起任何病症^[13]。在一般情况下,低拷贝数的内源 RNA 病毒在植物宿主中依然可以通过种子高速率传播^[20-21]。然而,Ikeda 等发现 HmEV1 是植物的弱毒力因子^[22]。Osaki 等发现 VfEV 与蚕豆雄性不育相关^[23]。现报道的 BPEV 宿主绝大部分为辣椒,Jo 等通过辣椒转录组拼接出 BPEV 全长和部分片段,同时进行重组分析预测出 BPEV-YW 在 4 852~5 363 之间插入了 Maor 的部分片段^[24]。本研究在芹菜上发现了 BPEV,是否是由于重组导致感染芹菜,还需进一步研究。

本研究从具有皱缩症状的芹菜中得到甜椒内源 RNA 病毒山西芹菜分离物 (BPEV-QC),利用部分扩增序列进行了同源性比较和系统进化分析,发现 BPEV-QC 与 BPEV IS、Maor、Kyosuzu、BPEV、lj、BPEV-YW 分离物的同源性在 80.0%~97.8% 之间,而与其他内源 RNA 病毒科分离物同源性较低,为 30.6%~37.6%;系统进化分析表明 BPEV-QC

与 BPEV IS、Maor、Kyosuzu、BPEV、lj 分离物形成一个独立分支,亲缘关系最近。但本试验的结果是基于 BPEV-QC 部分序列的比较,无法精确地确立其种属分类地位和变异进化关系,要想获得更全面的基因信息,还需进一步扩增其全长序列,明确其具体的基因组结构,进而研究其致病机理和病害流行规律。

参考文献

- [1] 夏俊强,王清和,严敦余,等. 引起芹菜花叶的一个病毒分离物[J]. 上海农业学报, 1986, 2(1): 53-58.
- [2] 王述杉,濮祖芹. 南京芹菜病毒病病毒源鉴定[J]. 上海农业学报, 1993, 9(3): 76-82.
- [3] Xu Donglin, Liu H Y, Koike S T, et al. Biological characterization and complete genomic sequence of *Apium virus* Y infecting celery [J]. *Virus Research*, 2011, 155(1): 76-82.
- [4] Marco S. Occurrence and incidence of *Cucumber mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* on celery in Israel [J]. *Plant Disease Reporter*, 1975, 59(11): 915-917.
- [5] Hollings M. Some properties of five viruses of celery (*Apium graveolens* L.) in Britain [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1964, 39: 130-142.
- [6] Tzanetakis I E, Martin R R. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149(1): 167-170.
- [7] 牛颜冰,时晓丽,赵慧琪,等. 白术矮化病毒病原的分子鉴定和部分序列分析[J]. *植物病理学报*, 2014, 44(4): 357-362.
- [8] 牛颜冰,王德富,姚敏,等. 侵染苘麻的烟草花叶病毒鉴定[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(2): 187-188.
- [9] 牛颜冰,姚敏,王德富,等. 臭椿病毒病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(4): 437-440.
- [10] 牛颜冰,时晓丽,张西梅,等. 侵染白术的蚕豆萎蔫病毒 2 号的分子检测与序列分析[J]. *病毒学报*, 2015, 31(1): 58-64.
- [11] Fukuhara T, Koga R, Aoki N, et al. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(5): 995-1002.
- [12] Roossinck M J. Lifestyles of plant viruses [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2010, 365(1548): 1899-1905.
- [13] Okada R, Kiyota E, Sabanadzovic S, et al. *Bell pepper endornavirus*: molecular and biological properties, and occurrence in the genus *Capsicum* [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92: 2664-2673.
- [14] Okada R, Kiyota E, Moriyama H, et al. A new endornavirus species infecting Malabar spinach (*Basella alba* L.) [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(4): 807-809.

麦条纹花叶病毒(BSMV)介导的基因沉默(virus inducing gene silencing, VIGS)系统分析 *TaWIR1* 基因的功能时发现,虽然在病菌诱导后该基因出现上调表达,但并未发现对小麦白粉菌的定殖有影响^[1-2]。同时在小麦中过表达 *TaWIR1a* 对于白粉菌吸器的形成不产生影响^[11]。沉默试验小麦材料‘Renan’中全部 *TaWIR1* 基因对于小麦白粉菌的发育没有显著影响^[12]。Diethelm 等则认为该基因对活体营养型病原物和死体营养型病原物的作用是截然相反的,其在植物与死体营养型的病原菌互作时参与抗病过程^[10]。小麦全蚀菌属于死体营养型病原物,其启动的小麦抗性和防御反应很可能与同是死体营养型的小麦赤霉菌模式相同,下一步需要深入开展 *TaWIR1b* 基因在‘新农 19’与全蚀菌互作中的功能研究,为阐明基因的作用机理及进一步利用奠定基础。

参考文献

- [1] Schweizer P, Hunziker W, Mösinger E. cDNA cloning, *in vitro* transcription and partial sequence analysis of messenger RNA from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12(6): 643 - 654.
- [2] Bull J, Mauch F, Hertig C, et al. Sequence of a wheat gene encoding a novel protein associated with pathogen defense [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1992, 5(6): 516 - 519.
- [3] 徐飞, 杨共强, 何文兰, 等. 不同小麦品种(系)对全蚀病的抗性鉴定与评价 [J]. *植物保护*, 2013, 39(2): 143 - 146.
- [4] Spencer D F, Schnare M N, Coulthart M B, et al. Sequence and
- (上接 146 页)
- [15] Urayama S, Moriyama H, Aoki N, et al. Knock-down of Os-DCL2 in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa endornavirus* [J]. *Plant Cell Physiology*, 2010, 51(1): 58 - 67.
- [16] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. *Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses* [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [17] 洪健, 周雪平. ICTV 第八次报告的最新植物病毒分类系统 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35(6): 1 - 9.
- [18] 张忠信. ICTV 第九次报告对病毒分类系统的一些修改 [J]. *病毒学报*, 2012, 28(5): 595 - 599.
- [19] Song D, Cho W K, Park S H, et al. Evolution of and horizontal gene transfer in the *Endornavirus* genus [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): 8750.
- [20] Horiuchi H, Fukuhara T. Putative replication intermediates in

organization of a 7.2 kb region of wheat mitochondrial DNA containing the large subunit (26S) rRNA gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(2): 347 - 352.

- [5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [6] Neu C, Keller B, Feuillet C. Cytological and molecular analysis of the *Hordeum vulgare-Puccinia triticina* nonhost interaction [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(7): 626 - 633.
- [7] Jansen C, Korell M, Eckey C, et al. Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes [J]. *Plant Sciences*, 2005, 168: 373 - 380.
- [8] Hulbert S H, Bai J, Fellers J P, et al. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene *Lr34/Yr18* [J]. *Phytopathology*, 2007, 97(9): 1083 - 1093.
- [9] Coram T E, Huang X L, Zhan G M, et al. Meta-analysis of transcripts associated with race-specific resistance to stripe rust in wheat demonstrates common induction of blue copper-binding protein, heat-stress transcription factor, pathogen-induced WIR1A protein, and ent-kaurene synthase transcripts [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2010, 10(3): 383 - 392.
- [10] Diethelm M, Rhiel M, Wagner C, et al. Gene expression analysis of four WIR1-like genes in floret tissues of European winter wheat after challenge with *G. zeae* [J]. *Euphytica*, 2012, 186(1): 103 - 114.
- [11] Schweizer P, Pokorný J, Abderhalden O, et al. A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12(8): 647 - 654.
- [12] Tufan H A, Mcgrann G R D, McCormack R, et al. *TaWIR1* contributes to post-penetration resistance to *Magnaporthe oryzae*, but not *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, in wheat [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(7): 653 - 665.

(责任编辑: 杨明丽)

Endornavirus, a novel genus of plant dsRNA viruses [J]. *Virus Genes*, 2004, 29(3): 365 - 375.

- [21] Valverde R A, Gutierrez D L. Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an *Endornavirus* [J]. *Virus Genes*, 2007, 35(2): 399 - 403.
- [22] Ikeda K I, Nakamura H, Matsumoto N. Hypovirulent strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 69(2): 385 - 390.
- [23] Osaki H, Nakamura H, Sasaki A, et al. An *endornavirus* from a hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa* [J]. *Virus Research*, 2006, 118(1/2): 143 - 149.
- [24] Jo Y, Choi H, Yoon J Y, et al. In silico identification of *Bell pepper endornavirus* from pepper transcriptomes and their phylogenetic and recombination analyses [J]. *Gene*, 2015, 575(3): 712 - 717.

(责任编辑: 杨明丽)