

两种桑树病毒的形态观察与检测

孙勋勋¹, 周轶楠¹, 黄吉雷², 易辉玉¹, 田 铃¹, 刘吉平^{1*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 亚太地区蚕桑培训中心, 广州 510642;

2. 华南农业大学测试中心, 广州 510642)

摘要 桑树病毒病一直是影响蚕桑产业发展的重要因素之一,但其病原也尚未完全确认。本研究收集全国不同桑园、不同时间和不同品种的皱缩状和花叶状桑叶样品,分离病毒后使用透射电子显微镜观察病毒形态特征。结果在桑病叶中分离获得两种病毒,一种为双联体形态病毒,长 (27.84 ± 1.71) nm,宽 (17.05 ± 1.13) nm,形态特征与双生病毒属的病毒形态特征一致;另一种为球状体病毒 $(80 \sim 100)$ nm,形态特征与番茄斑萎病毒属的病毒形态特征一致;桑叶切片观察,发现同一桑叶材料中存在这两种病毒。通过高通量测序发现其存在桑花叶型萎缩病相关病毒 *Mulberry mosaic dwarf associated virus* (MMDaV) 和桑脉带相关病毒 *Mulberry vein banding associated virus* (MVBaV)。设计上述病毒的特异引物,对 158 份桑病叶进行 PCR 检测, MMDaV 的检出率为 93.04%;而 MVBaV 为 60.13%,同时检出率为 57.59%。结果表明, MMDaV 和 MVBaV 在桑病叶中普遍存在,且同时存在。本研究首次在桑病叶中同时观察并检测到 MMDaV 和 MVBaV,二者在桑皱缩状和花叶状的桑叶中存在混合感染的现象,研究结果将为今后深入研究桑病毒病及防控奠定了基础。

关键词 桑树病毒病; 桑花叶型萎缩病相关病毒; 桑脉带相关病毒; 形态特征; PCR 检测

中图分类号: S 432.4+1 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018419

Morphological observation and detection of two mulberry virus

SUN Xunxun¹, ZHOU Yinan¹, HUANG Jilei², YI Huiyu¹, TIAN Ling¹, LIU Jiping¹

(1. College of Animal Science, Regional Sericulture Training Centre For Asia-Pacific, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Test Center of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Mulberry viral disease is one of the most important factors affecting the development of sericultural industry, but the pathogens of mulberry viral disease have been long unclear. In this study, two viruses were isolated from the diseased mulberry leaf samples with crinkle or mosaic leaf symptoms collected from different varieties and different sericultural regions in China at different time and further examined by transmission electron microscope. One virus showed similar morphological features to geminivirus, and the length of virus particles was (27.84 ± 1.71) nm and width was (17.05 ± 1.13) nm. Another was a globular virus with the length between 80 and 100 nm and showed similar morphological features to *Tospovirus*. Both virus particles were observed in one mulberry leaf, and *Mulberry mosaic dwarf associated virus* (MMDaV) and *Mulberry vein banding associated virus* (MVBaV) were detected through high-throughput sequencing. Furthermore, 158 diseased mulberry leaf samples of mulberry leaf were detected by specific identification PCR. The detection rates of MMDaV and MVBaV were 93.04% and 60.13%, respectively, and the detection rate of both was 57.59%. This was the first report that MMDaV and MVBaV were detected to coexist in the diseased mulberry leaf, which will provide a foundation for future study of mulberry viral diseases.

Key words mulberry viral disease; *Mulberry mosaic dwarf associated virus*; *Mulberry vein banding associated virus*; morphological character; PCR detection

桑树为木本植物,属蔷薇目 Rosales、桑科 Moraceae、桑属 *Morus*。随着蚕桑产业的转型发展,

桑树从传统的单一养蚕植物,逐渐成为多功能、多产品的植物资源^[1-2],因此桑叶质量也越来越被关注。

收稿日期: 2018-09-27 修订日期: 2018-11-29

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-18-ZJ0304);2017 年省级农业发展和农村工作专项资金(2017LM4168);2018 年度广东省农业标准化计划项目;2017 年度广东省农业标准化计划项目

致谢: 广东、广西、海南和重庆各地的蚕种场,蚕桑科研机构同仁在收集桑叶样品方面给予了极大帮助,在此表示由衷的感谢,同时感谢华南农业大学蚕桑系刘伟强和黄志君老师给予的指导和帮助。

* 通信作者 E-mail: liujiping@scau.edu.cn

桑树病害是影响桑叶质量的重要因素之一,其中植物病毒对桑树的危害也一直未被解决。至今,已报道的桑树病毒有桑环斑病毒 *Mulberry ringspot virus*、桑花叶病毒 *Mulberry mosaic virus*、桑坏死病毒 *Mulberry necrosis virus*、桑潜隐病毒 *Mulberry latent virus*、桑脉带相关病毒 *Mulberry vein banding associated virus*、桑花叶型萎缩病相关病毒 *Mulberry mosaic dwarf associated virus*、桑花叶卷叶相关病毒 *Mulberry mosaic roll leaf associated virus* 和桑杆状 DNA 病毒 1 *Mulberry badnavirus 1* 等。其中,只有桑环斑病毒、桑花叶卷叶相关病毒、桑花叶型萎缩病相关病毒和桑杆状 DNA 病毒 1 四种被国际病毒分类委员会(ICTV)收录,但它们与桑树症状之间的确切关系尚未确定。

有关桑树病毒病的报道最早出现于 1936 年,当时统称为桑花叶病。20 世纪 60 年代后,随着病毒分离、分子生物学等技术的发展,有关桑树病毒的分离和鉴定的研究报道才逐渐多了起来。1971 年, Tsuchizaki 等在带有环斑状和丝叶状的病叶中分离并在切片中观察到一种球状病毒(直径 22 nm)^[3]。1976 年, Tsuchizaki 等又从花叶等系统性褪绿斑的病叶中分离出另一种线型病毒(长约 700 nm)^[4]; 1983 年,舒秀珍等从系统性褪绿褐色环斑状的桑叶中分离到一种球形病毒(直径约 26 nm)^[5]。1988 年,陈俊英等连续三年从丝状和花叶状的桑叶中分别分离出一种线形病毒(长 600~700 nm,宽 11~12 nm)^[6]; 1988 年,张月季等从表现大斑块花叶的桑叶中分离一种球形病毒(直径 25~30 nm)^[7]; 2014 年, Marei 等从花叶、黄叶和畸形等症状的桑叶中发现一种双生病毒(双联体长 57 nm)^[8]。虽然在桑树中分离并观察到各种不同的病毒,但很难鉴定病毒的种类,即使电镜观察也不能完全反映病毒的真实特征。

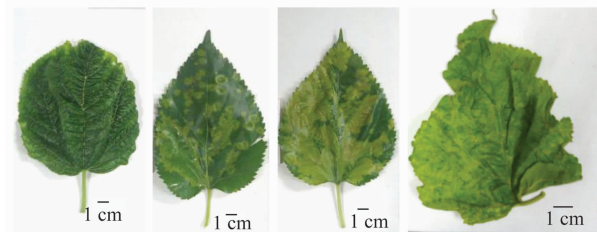
分子生物学手段是研究桑树病毒病的重要方式。近 5 年来,利用分子生物学手段,桑树中的病毒不断被发现。2013 年, Elbeaino 等从花叶状和脉带状的桑叶中分离观察到一种桑杆状 DNA 病毒 1 (150 nm×30 nm),并通过简并寡核苷酸引物 PCR (DOP-PCR) 检测到 DNA 杆状病毒 1 的序列^[9]。2014 年,卢全有在桑病毒病叶片中分离到桑花叶卷叶病相关病毒(28~30 nm),并结合各种分子生物学方法鉴定该病毒属于线虫传多面体病毒属^[10]。2015 年, Meng 等在花叶和丝叶状的桑叶中观察到一种球状病毒,并通过高通量测序发现桑脉带相关病毒^[11]。2015 年, Ma 等通过高通量测序等分子手

段在带有花叶和皱缩状的桑叶中检测桑花叶型萎缩病相关病毒^[12], Lu 等也在皱缩的桑叶中检测到桑花叶型萎缩病相关病毒^[13]。2016 年, Chiumenti 等通过高通量测序在带有环斑及黄脉的病叶中发现桑杆状 DNA 病毒 1^[14]。分子生物学手段结合形态学观察的方法已经被广泛应用于桑树病毒的研究上,并且高通量测序已经广泛应用于快速检测木本植物病毒上^[15]。本文结合病毒显微观察、高通量测序和 PCR 检测技术对桑树病毒进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

收集的桑病叶主要有 3 种症状类型(图 1): 1) 叶片表现为皱缩畸形(图 1a)。2) 叶片花叶,带有褪绿斑(环斑的图 1b 和大斑块的图 1c)。3) 叶片表现为褪绿和畸形两种症状的花叶皱缩状(图 1d)。



a: 皱缩桑叶; b: 环斑桑叶; c: 大斑块桑叶; d: 花叶皱缩
a: Crinkle mulberry leaf; b: Ringspot mulberry leaf; c: Big-spot mosaic leaf; d: Mosaic and crinkle mulberry leaf

图 1 带有疑似病毒病症状的桑叶

Fig. 1 Mulberry leaves with suspected various symptoms



a: 广东、广西和海南三个省区的样本采集示意图; b: 重庆市样本采集示意图, 红色叶子表示采集的地点位置

a: Sample location of three provinces, Guangdong, Guangxi and Hainan; b: Sample location of Chongqing

图 2 桑叶样本采集位置示意图

(依据国家测绘地理信息局中国地图)

Fig. 2 Map of mulberry leaf sample location
(according to the national map drawn by National Bureau of Surveying and Mapping Geographic Information)

供试的桑病叶材料采集地点主要有两类。一类收集于华南农业大学蚕桑教学实践园(简称桑园), 包括不同时间从不同桑品种上采集的桑病叶样品, 共计 115 份, 其中 2017 年 4 月采集 52 份、2017 年 9

月到11月采集的26份,2018年2月采集的37份。16个县市(图2)收集的43份桑病样。各地采集的另一类为采集于广东、广西、海南和重庆4个省区共具体时间、地点和症状信息见表1~2。

表 1 不同地区桑病叶材料症状信息表

Table 1 Sample numbers based on symptoms on mulberry diseased leaf

采集地点和时间 Location and time	带有花叶状样品数 Number of samples with mosaic	带有皱缩状样品数 Number of samples with wrinkle	带有两种症状的样品数 Number of samples with two symptoms	样品总数 Number of samples with symptoms
桑园 2017 年 4 月 April, 2017, from mulberry garden	31	43	22	52
桑园 2017 年 9 月到 11 月 September to November, 2017, from mulberry garden	15	15	4	26
桑园 2018 年 2 月 February, 2018, from mulberry garden	24	37	24	37
4 省区 2017 年 6 月到 10 月 June to October, 2017, from four provinces	32	33	22	43
合计样品数 Total samples	102	128	72	158

表 2 不同地区桑叶样品采集信息表

Table 2 Collection of mulberry leaf samples from different regions

采集时间/年-月-日 Time	采集地点 Location	采集时间/年-月-日 Time	采集地点 Location
2017-06-15	广东翁源县龙仙镇	2017-08-14	广东罗定市黎少镇
2017-07-10	广东英德市大站镇英德蚕种场	2017-08-14	广东罗定市箇卜镇
2017-07-17	广西宾阳县大桥镇	2017-08-14	广东罗定市素龙镇
2017-07-18	广西柳城县冲脉镇	2017-08-15	广东化州市名萁园
2017-07-19	广西柳城县凤山镇	2017-08-15	广东化州市那务镇
2017-08-01	广东英德市石钴镇	2017-08-16	广东阳江市合水镇
2017-08-03	海南琼中黎族苗族自治县红毛镇	2017-09-18	华南农业大学 24 号楼蚕培中心
2017-08-05	海南儋州市那大镇	2017-10-13	广东佛山市顺德区太子休闲农庄
2017-08-06	海南昌江黎族自治县石碌镇	2017-10-21	广东阳山县阳山蚕种场
2017-08-12	广东连南瑶族自治县三排镇	2017-10-22	广东阳山县小江镇
2017-08-14	广东罗定市生江镇	2017-10-27	重庆市垫江县桂溪镇
2017-08-14	广东罗定市罗平镇	2017-10-29	重庆市西南大学桑园

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离纯化及超薄切片的制作

桑花叶型萎缩病相关病毒的分离纯化方法: 1) 桑病叶 50 g, 加入 2 mL/g 的缓冲溶液(0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液, pH 6.0, 5 mL/L β-巯基乙醇), 打碎过滤。2) 滤液氯仿乳化(1 mL/3 g 叶片), 10 000 g 离心 10 min, 取上清。3) 加入固体聚乙二醇 6000 (70 g/L) 和氯化钠(0.2 mol/L), 4℃下搅拌 3 h, 10 000 g离心 25 min, 去上清。4) 加入 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液悬浮, 4℃放置 24 h。5) 10 000 g 离心 30 min, 取上清, 重复两次。6) 加入 10% 氯仿, 混匀, 10 000 g 离心 30 min, 取上清。加入到 10%~40% 的蔗糖密度梯度离心, 300 000 g 离心 1 h。取悬浮病毒带, 302 000 g 沉降离心 1.5 h, 悬浮沉淀, 获得纯的病毒悬浮液, 放置于 4℃备用。

桑脉带相关病毒粗悬液的制备: 1) 桑病叶 50 g, 加入 3 mL/g 的缓冲液(0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液, pH 7.0, 5 mL/L β-巯基乙醇), 打碎过滤。2) 滤

液 10 000 g 离心 15 min。3) 去上清, 加入 3 mL/g 的缓冲液, 使用小研杵和磁力搅拌器将沉淀物轻轻混匀 30 min。4) 8 000 g 离心 15 min 澄清, 收集上清液 100 000 g 离心 30 min, 去上清。5) 沉淀中加入 2.5 mL 缓冲溶液, 加入到 10%~40% 蔗糖梯度离心, 70 000 g 离心 45 min, 收集含有病毒颗粒的乳白色带。6) 加入 1:1 的缓冲液稀释, 100 000 g 离心 1 h 浓缩。7) 将病毒颗粒的沉淀以约 1 mg/mL 的浓度重悬浮于无菌双蒸水中。

桑病叶超薄切片观察: 1) 桑病叶样品切片, 使用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗 4 次, 每次 15 min, 注射器抽出叶片中的空气。2) 桑病叶样品用 5% 戊二醛 4℃固定过夜, 用磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)漂洗 4 次, 每次 15 min。3) 1% 的钨酸固定过夜, 磷酸缓冲液漂洗 4 次, 每次 15 min。4) 依次使用 30%、50%、70%、80%、90% 乙醇脱水各 10 min、100% 乙醇脱水两次, 每次 15 min, 100% 的丙酮脱水两次, 每次 15 min。5) 丙酮/树脂不同比例渗透(3:1

4 h, 1:1 17 h, 1:3 8 h, 纯树脂 24 h), 70℃ 聚合 24 h。

6) 包埋块切成 70 nm 的超薄切片。

1.2.2 桑树中病毒的形态学观察

病毒离心液负染观察: 碳膜铜网吸附病毒悬浮液 5 min, 再用 2% 的醋酸双氧铀负染 2 min, 样品干燥后置于 120 kV 透射电镜下观察。

超薄切片观察: 超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 样品干燥后置于 120 kV 透射电镜下观察。

1.2.3 桑叶总 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法抽提植物基因组 DNA。将研磨后的材料 0.05 g 粉末加入 1.5 mL EP 管中, 加入 2% CTAB (含 0.1% β -巯基乙醇) 缓冲液 600 μ L 重悬, 振荡混匀, 65℃ 水浴 3~4 h; 冷却后, 加入等体积酚/氯仿, 振荡混匀 5 min, 12 000 r/min, 离心 5 min, 取水相上清; 加入 400 μ L 氯仿抽提 1 次, 取上清; 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀数次, 4℃ 放置 1 h 以上, 将全部液体吸入到核酸纯化吸附柱套件中, 12 000 r/min, 30 s 过滤, 弃滤液; 用 70% 乙醇 500 μ L 洗涤, 12 000 r/min, 30 s 过滤两次, 最后空离 1 次; 将吸附柱放置一新的 EP 管中, 加 30 μ L ddH₂O 溶解 DNA, 使用核酸微量分光光度计检测核酸质量, 检测合格后, 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 桑叶总 RNA 的提取及反转录合成 cDNA

使用 Magen 的 RNA 提取试剂盒 (HiPure Plant RNA Mini Kit) 提取桑叶总 RNA, 并使用核酸微量分光光度计检测质量, 检测合格使用 TaKaRa 反转试剂盒合成 cDNA 置于 -20℃ 备用, 总 RNA 置于 -80℃ 储藏。

1.2.5 高通量测序及 PCR 检测

将皱缩状和花叶状桑叶分别送广州瑞科基因科技有限公司进行转录组高通量测序和基因组 DNA 高通量测序。

桑脉带相关病毒的 RT-PCR 检测, 根据桑脉带相关病毒核壳体蛋白核苷酸序列 (KM819701.1) 设计筛选获得引物: 上游引物 S2776F: 5'-CATAG-CATCAGCCTCAA-3'; 下游引物 S3225R: 5'-GT-CTACCGTCCGTCAGC-3'。反应体系 20 μ L, 包括 2×Taq Master Mix 10 μ L, ddH₂O 7 μ L, 桑病叶总 DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L。PCR 条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

桑花叶型萎缩病相关病毒的 PCR 检测, 检测特异引物为 MCP746F/MCP1148R^[16]。上游引物

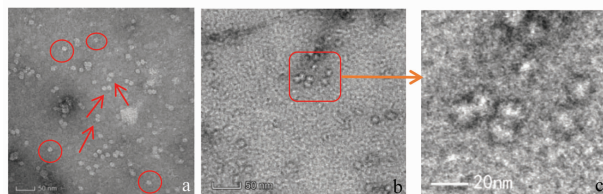
MCP746F: 5'-CGAGTTTGGCAAGAAGGAAGAG-3'; 下游引物 MCP1148R: 5'-TTGGCTCCCACTAA-ATGAAAGG-3'。反应体系 20 μ L, 包括 2×Taq Master Mix 10 μ L, ddH₂O 7 μ L, 桑病叶总 DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, PCR 条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 桑树病毒的形态特征

分别从不同症状的桑叶中分离纯化病毒, 病毒悬浮液复染后在透射电子显微镜下观察 (图 3), 从皱缩、花叶和携带两种症状的三类桑叶中均能分离到双联体形态的病毒粒子 (图 3a~b 箭头所示); 随机选取其中 20 个单病毒粒子以及 20 个双联体病毒粒子, 使用明美显微数码分析系统测量病毒大小, 20 个双联体病毒粒子的平均直径为 (27.84±1.71) nm, 20 个单体平均直径为 (17.05±1.13) nm。另外, 从花叶状和携带两种症状的桑叶中还分离到一种被囊泡包裹的球状病毒 (图 5a), 其大小约为 (80~100) nm。

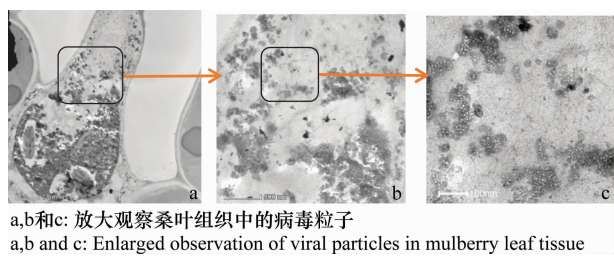
对不同症状的桑叶组织切片的电镜观察显示 (图 4a~c、图 5b), 在带有皱缩和花叶两种症状的桑叶中观察到双联体病毒和球状病毒。桑叶细胞如同自噬般萎缩成葫芦状, 难以分辨细胞器及组成, 细胞内所有的黑色范围均聚集大量的病毒颗粒, 放大观察, 多个颗粒聚集一起, 也存在明显的双联体结构, 大小约为 17 nm×28 nm (图 4a~c), 该结果与分离的双联体病毒粒子形态一致。另外, 还有些细胞无明显的细胞器结构, 且分布着一些被 200~400 nm 囊泡包裹的球状体, 大小约为 80~100 nm, 这与分离的球状病毒粒子形态相同。



a: 病毒粒子; b和c: 放大观察病毒粒子形态; a中箭头所指为病毒双联体, 圆圈中为病毒单体
a: Viral particle; b and c: Enlarged observation of viral particle morphology; The arrow indicated the conjoined virus particles and the circle indicated the monomer

图 3 桑花叶型萎缩病相关病毒 MMDaV 病毒粒子的透射电镜观察

Fig. 3 Observation of the purified virus particles of MMDaV by transmission electron microscope



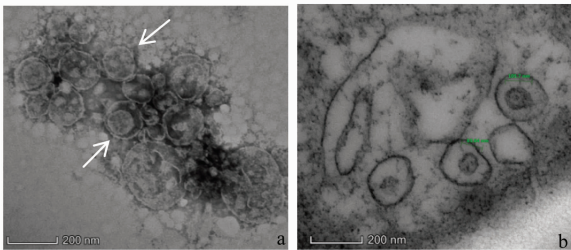
a,b和c: 放大观察桑叶组织中的病毒粒子
a,b and c: Enlarged observation of viral particles in mulberry leaf tissue

图 4 桑花叶型萎缩病相关病毒 MMDaV 的组织切片观察
Fig. 4 Observation of MMDaV in tissue slices by transmission electron microscope

2.2 桑病叶高通量测序分析

高通量检测结果(表 3)所示,在皱缩样品中检测到的 DNA 病毒序列,对比到的 DNA 病毒仅有桑花叶型萎缩病相关病毒(MMDaV),占有可读序列的 0.001 8%;在花叶样品中检测到的 RNA 病毒

序列,对比到的 RNA 病毒仅有桑脉带相关病毒(MVBaV),占有可读序列的 0.490 8%,未发现其他病毒。



a: 分离纯化的MVBaV; b: 皱缩花叶状桑叶组织切片中的病毒粒子
a: Purified MVBaV particles; b: Virus particles from diseased mulberry leaf tissues with mosaic and dwarf symptoms

图 5 透射电镜观察桑脉带相关病毒 MVBaV
Fig. 5 Observation of MVBaV by transmission electron microscope

表 3 桑病叶高通量检测分析结果

Table 3 Analysis results of high throughput detection of mulberry disease leaf

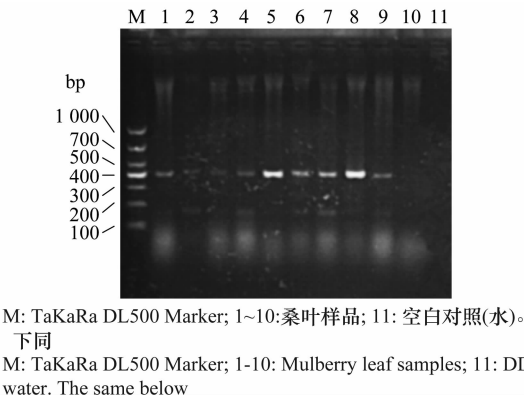
测序对象 Sequencing object	总测序 序列读数 Total reading of sequencing	桑树测序 序列读数 The reading of mulberry sequencing	桑树测序读数占 总读数比/% Ratio of mulberry sequencing reading accounting for total reading	病毒 序列读数 The virus sequencing reading	病毒测序读数占 总读数比/% Ratio of the virus sequencing reading accounting for total reading	未知 序列读数 Unknown sequence readings	未知序列读数占 总读数比/% Ratio of unknown sequence readings accounting for total reading
DNA	33 189 170	30 412 586	91.634 1	602	0.001 8	2 775 882	8.364 1
RNA	48 525 596	46 677 311	96.191 1	238 177	0.490 8	1 610 108	3.318 1

2.3 PCR 检测桑树中的病毒

2.3.1 两种桑树病毒的 PCR 检测结果

利用特异性引物 MCP746F/MCP1148R,对桑花叶型萎缩病相关病毒(MMDaV)进行 PCR 检测,结果显示:桑病叶样品总 DNA 中均存在大小约为 400 bp 的条带(图 6:泳道 1~9),空白对照则没有出现反应条带(图 6),说明 PCR 反应体系没有污染,但泳道 10 没有出现目的条带,可能该样本不存在 MMDaV 病毒基因(图 6)。将 PCR 阳性结果送上海生工生物工程有限公司测序,测序结果与 DNA 病毒 MMDaV 序列相似度高达 97%,说明桑病叶材料中存在 MMDaV。

利用特异性引物 S2776F/S3225R 对桑脉带相关病毒(MVBaV)进行 RT-PCR 检测,结果(图 7)显示,泳道 3~9 桑病叶样品总 DNA 存在大小为 450 bp 左右的条带,空白对照 11 号泳道无条带,说明不存在污染,泳道 1、2 和 10 均无条带,可能样品中不存在目的病毒。将 450 bp 左右的 RT-PCR 结果送上海生工生物工程有限公司测序,测序结果与 RNA 病毒 MVBaV 相似度高达 99%,说明桑病叶样品中存在 MVBaV。



M: TaKaRa DL500 Marker; 1~10:桑叶样品; 11: 空白对照(水)。
下同
M: TaKaRa DL500 Marker; 1-10: Mulberry leaf samples; 11: DD water. The same below

图 6 PCR 检测桑叶中的 MMDaV

Fig. 6 PCR detection of MMDaV from mulberry leaf samples

2.3.2 不同桑叶样品中 MMDaV 和 MVBaV 检出率分析

对采集于不同时间、不同品种和不同地理位置的桑病叶中两种病毒进行检测,检测结果(图 8)显示,158 份桑病叶样品 MMDaV 的检出率为 93.04%(147/158),MVBaV 的检出率为 60.13%(95/158),共同检出率达 57.59%(91/158)。102 份表现花叶的桑叶中桑花叶型萎缩病相关病毒(MMDaV)的检出率为 95.10%(97/102),桑脉带相关病毒(MVBaV)

的检出率为 65.69%(67/102),共同检出率高达 64.71%(66/102);128 份表现皱缩的桑叶中 MM-DaV 的检出率为 92.97%(119/128),MVBaV 的检出率为 61.72%(79/128),共同检出率达 58.59%(75/128)。72 份同时携带两种症状的桑叶中 MM-DaV 检出率为 95.83%(69/72),MVBaV 的检出率为 70.83%(51/72),共同检出率达 69.44%(50/72)。

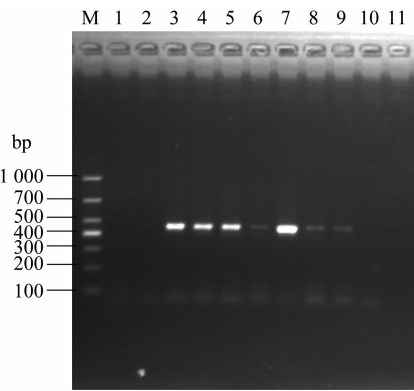


图 7 RT-PCR 检测桑叶中的 MVBaV

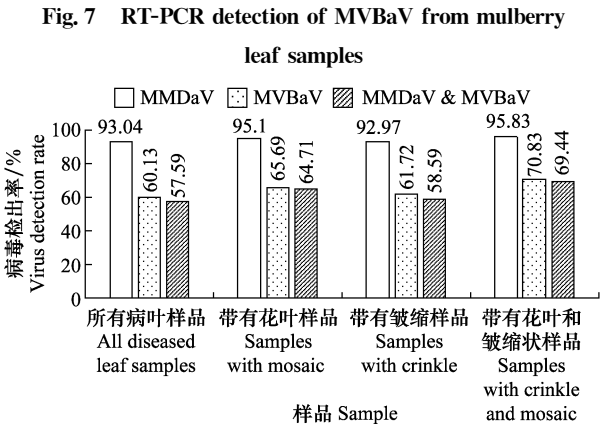


图 8 不同症状桑叶中两种病毒检出率分析

Fig. 8 Detection rates of two viruses in mulberry leaf samples with different symptoms

3 讨论

Ma 等在桑叶中发现桑花叶型萎缩病相关病毒 (MMDaV),并通过分子生物学分析认为该病毒属于双生病毒科病毒,但不属于现有的分类属^[12],但他并未观察到病毒的形态特征。本研究首次从皱缩状、花叶状和携带两种症状的三种桑叶中分离到双联体形态的病毒粒子,长(27.84±1.71) nm,宽(17.05±1.13) nm,该病毒粒子与双生病毒科病毒(20 nm×30 nm)的大小和形态特征^[17-18]一致。另外,从花叶和携带花叶及皱缩两种症状的桑叶中还分离到一种被囊泡(200~400 nm)包裹的球状病毒,其大小约为

(80~100) nm,这与 Meng 等在桑叶组织切片中观察到的球状体病毒类似^[11],与番茄斑萎病毒属的病毒形态一致^[19],后者也存在明显的囊泡结构。对桑叶进行切片观察,在带有花叶和皱缩两种症状的桑叶中同时观察到双联体形态病毒和球状病毒。对两种桑病叶中的 DNA 及 RNA 进行高通量测序,发现皱缩症状的桑叶中检测到 MMDaV,而花叶症状的桑叶中检测到 MVBaV,通过高通量测序也进一步确定了桑病叶中存在这两种病毒。PCR 检测均能在桑叶样品中发现这两种病毒,并且这两种病毒能在同一桑树病叶材料中被检测到。

分析不同时间、品种和地理位置的桑病叶中 MVBaV 和 MMDaV 两种病毒的检测结果,发现在 158 份桑病叶中,MMDaV 的检出率为 93.04%;MVBaV 的检出率为 60.13%;两种病毒同时检出率为 57.59%。这表明 MMDaV 和 MVBaV 在桑病叶中普遍存在,并且同一桑叶中存在这两种病毒的现象也很普遍。Meng 等^[11]在 2015 年从脉带、环斑和丝叶等花叶症状的桑叶中发现 MVBaV,并获得 MVBaV 的全基因组^[11],我们的结果进一步表明 MVBaV 与桑病毒病有关。2015 年,马宇欣采自陕西安康学院的 92 份桑病样中 MMDaV 的检出率高达 92.4%,线虫传多面体病毒为 52.17%,两种病毒存在混合感染的现象^[20],并且在辣椒^[21]、甜瓜^[22]、番茄^[23]等经济作物上均存在混合感染的情况,说明病毒的混合感染非常普遍。本研究也发现了桑叶中两种病毒混合感染的现象。

本研究首次从华南农业大学桑园及来自 4 个省区不同桑园的桑病叶中检测到 MMDaV 和 MVBaV 两种病毒,这两种病毒普遍存在于花叶和皱缩症状的桑叶中,且存在混合感染现象。因此在桑树病毒的研究中,需要考虑多种病毒混合感染情况;在病毒防治方面,也需要考虑对多种病毒进行防治,以加强防病和治疗的效果。

参考文献

[1] 封槐松,李建琴.我国蚕桑产业发展“十二五”回顾与“十三五”展望[J].中国蚕业,2016,37(1):4-10.
[2] 向仲怀,立桑为业 拓展提升[J].蚕业科学,2015,41(1):1-2.
[3] TSUCHIZAKI T, HIBINO H, SAITO Y. Mulberry ringspot virus isolated from mulberry showing ringspot symptom [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1971, 37(4):266-271.
[4] TSUCHIZAKI T. Mulberry latent virus isolated from mulberry

- (*Morus alba* L.) [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1976, 42(3): 304–309.
- [5] 舒秀珍, 胡伟贞, 沈淑琳, 等. 侵染大豆和桑的烟草坏死病毒 (TNV) 的鉴定 [J]. 植物保护学报, 1983, 11(1): 71–73.
 - [6] 陈俊英, 洛海学. 桑花叶病病原研究初报 [J]. 广东蚕桑通报, 1988(4): 63–64.
 - [7] 张月季, 洪健, 徐正, 等. 浙江省桑树两种花叶病的初步报道 [J]. 科技通报, 1988(2): 43–44.
 - [8] MAREI E M, ELBAZ R M, ELMAGHRABY I, et al. Occurrence of mulberry mosaic virus in Egypt [J]. International Journal of Microbiology, 2014, 6(2): 575–580.
 - [9] ELBEAINO T, CHIUMENTI M, DE STRADIS A, et al. Identification of a badnavirus infecting mulberry [J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(1): 201–210.
 - [10] 卢全有. 桑树中一种新病毒和一种小分子环状 RNA 的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
 - [11] MENG Jiaorong, LIU Pingping, ZHU Liling, et al. Complete genome sequence of mulberry vein banding associated virus, a new tospovirus infecting mulberry [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136196.
 - [12] MA Yuxin, NAVARRO B, ZHANG Zhixiang, et al. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with *Mulberry mosaic dwarf disease* [J]. Journal of General Virology, 2015, 96(8): 2421–2434.
 - [13] LU Quanyou, WU Zujian, XIA Zhisong, et al. Complete genome sequence of a novel monopartite geminivirus identified in mulberry (*Morus alba* L.) [J]. Archives of Virology, 2015, 160(8): 2135–2138.
 - [14] CHIUMENTI M, MORELLI M, DE STRAD A, et al. Unusual genomic features of a badnavirus infecting mulberry [J]. Journal of General Virology, 2016, 97(11): 3073–3087.
 - [15] 马宇欣, 李世访. 高通量测序技术在鉴定木本植物双生病毒中的应用 [J]. 植物保护, 2016, 42(6): 1–10.
 - [16] 孙勋勋, 杨宏宇, 刘吉平. 桑花叶型萎缩病相关病毒的初步检测 [C]//中国蚕学会. 中国蚕学会第九届青年学术研讨会会议论文集, 2017.
 - [17] 龚祖坝, 沈菊英, 郑巧兮, 等. 我国第一例双联病毒——烟草曲叶病病毒的分离及电镜检定 [J]. 科学通报, 1982, 27(22): 1393.
 - [18] MUNIYAPPA V, SWANSON M M, DUNCAN G H, et al. Particle purification, properties and epitope variability of Indian tomato leaf curl geminivirus [J]. Annals of Applied Biology, 1991, 118(3): 595–604.
 - [19] 张仲凯. 番茄斑萎病毒属病毒粒子在寄主植物中的装配与运动机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
 - [20] 马宇欣. 桑花叶型萎缩病病原的鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
 - [21] 左琳彧, 雍容婧, 袁雯, 等. 北京地区辣椒上黄瓜花叶病毒和甜菜西方黄化病毒复合侵染的分子鉴定 [J]. 植物保护, 2016, 42(3): 181–183.
 - [22] 杨世安, 李战彪, 秦碧霞, 等. 广西三种甜瓜病毒分离物的分子检测与鉴定 [J]. 植物保护, 2017, 43(3): 83–89.
 - [23] 刘微, 史晓斌, 唐鑫, 等. 云南番茄褪绿病毒和番茄黄化曲叶病毒复合侵染的分子鉴定 [J]. 园艺学报, 2018, 45(3): 552–560.
- (责任编辑: 杨明丽)
-
- (上接 236 页)
- [17] 任春光, 桑维钧, 刘曼. 撑绿杂交竹根腐病的病原鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2011, 30(6): 5–7.
 - [18] BELISARIO A, FORTI E, CORAZZA L. Collar and root rot of walnut trees, associated with *Fusarium solani* [J]. Petria, 1999, 9(3): 277–282.
 - [19] PADAGANUR G M, KACHAPUR M R, NAIK K S, et al. *Hibiscus sabdariffa* L., a new host to *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. [J]. Plant Pathology Newsletter, 1988, 6(1/2): 13.
 - [20] RATHNAMMA K, KHAN A N A, FAROOQUI A A, et al. Root-rot of garden rue (*Ruta graveolens* L.) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. emend Synder and Hansen—a new record [J]. Advances in Plant Science Research in India, 1999, 9: 41–48.
 - [21] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. Dictionary of Fungi [M]. CAB International, 2001.
 - [22] 朱蕾. 蒙古黄芪根腐病病原菌的分离鉴定及药剂筛选防治研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010: 1–46.
 - [23] TOUSSOUN T A, SNYDER W C. Germination of chlamydospores of *Fusarium solani* f. *phaseoli* in unsterilized soils [J]. Phytopathology, 1961, 51(9): 620–623.
 - [24] KERLING L C P, BRAVENBOER L. Foot rot of *Cucurbita ficiifolia*, the rootstock of cucumber, caused by *Nectria haematococca* var. *cucurbitae* [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1967, 73: 15–24.
 - [25] PATERNOTE S J. Pathogenicity of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 to courgette [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1987, 93(6): 245–252.
 - [26] LI B J, LIU Y, SHI Y X, et al. First report of crown rot of grafted cucumber caused by *Fusarium solani* in China [J]. Plant Disease, 2010, 94(11): 1377.
 - [27] 王勇, 杨秀荣, 杨依军, 等. 茄根腐病致病病原-茄病镰刀菌及其蓝色变种的生物学特性研究 [J]. 天津农学院学报, 2002, 9(2): 21–25.
 - [28] 吴仁锋, 杨绍丽, 万鹏, 等. 豇豆根腐病病原分离鉴定及其核糖体 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(24): 5107–5110.
 - [29] 闫文雪, 石延霞, 李盼亮, 等. 大白菜枯萎病病原镰刀菌种类的初步研究 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 587–593.
 - [30] 杨静美, 陈健, 罗金堂, 等. 番木瓜茄病镰刀菌的生物学特性研究 [J]. 中国热带农业, 2011, 38(1): 56–58.
- (责任编辑: 杨明丽)