锦紫苏类病毒研究进展

姜冬梅[1]， 张志想[2]， 李世访[2*]

（1. 北京市农林科学院，北京农业质量标准与检测技术研究中心，北京 100097；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要 锦紫苏又名彩叶草，是一种草本观赏植物，可以被马铃薯纺锤块茎类病毒科锦紫苏类病毒属的类病毒侵染。目前为止，共发现了6种锦紫苏类病毒，分别为锦紫苏类病毒-1～锦紫苏类病毒-6(CbVd-1～CbVd-6)，它们具有共同的中央保守区(CCR)，存在广泛的分子间重组，其嵌合体的发现为研究类病毒RNA重组提供了较为理想的试验材料。本文系统综述了锦紫苏类病毒的分类地位及分子特征、检测方法、与寄主互作等方面的研究进展，并对锦紫苏类病毒研究中的热点和难点问题进行了讨论和展望。

关键词 类病毒； 锦紫苏； RNA重组； 寄主

中图分类号： S 432.4 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2020325

Research progress in coleus viroids

JIANG Dongmei[1]， ZHANG Zhixiang[2]， LI Shifang[2*]

（1. *Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing*，*Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences*，*Beijing* 100097，*China*；2. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*，*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract Coleus（*Coleus blumei*）is an ornamental plant grown worldwide and can be infected by several viroids in the genus *Coleviroid*，family *Pospiviroidae*. Up to now，six viroids that infect coleus have been reported：*Coleus blumei viroid*-1 to *Coleus blumei viroid*-6（CbVd-1—CbVd-6）. They share a common central conserved region（CCR）. Moreover，intermolecular recombination is common among them，and existence of chimeras provides an ideal experimental material for the study of RNA recombination in viroids. In this paper，the taxonomy，molecular characteristics，detection methods and the interactions between hosts and coleus viroids were reviewed. Furthermore，the focal and difficult problems in coleus viroids were prospected.

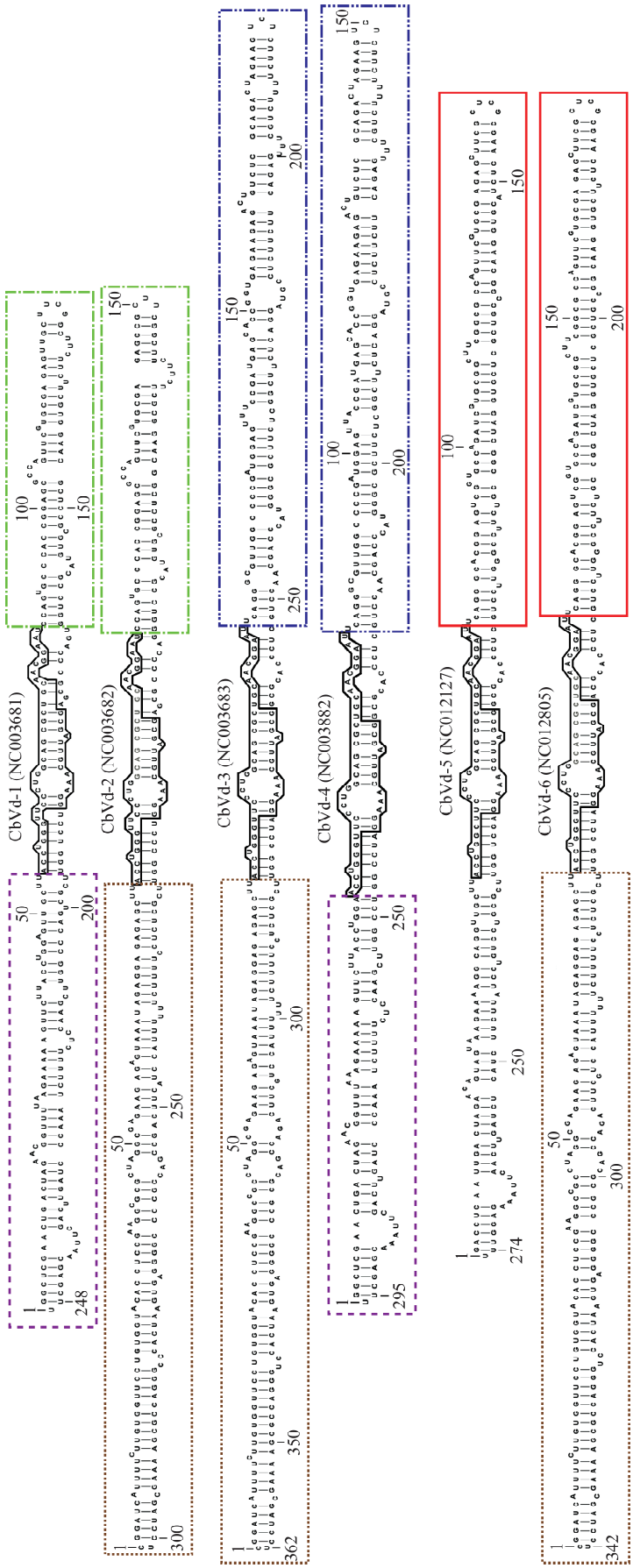
Key words viroid； coleus； RNA recombination； host

类病毒(viroid)是一类单链共价闭合环状的RNA分子，无蛋白外壳包裹，由246～435个核苷酸(nucleotide，nt)组成，是目前已知的最小植物病原物，可侵染许多重要的果树、观赏植物以及蔬菜等[1]。锦紫苏又名彩叶草，是一种草本观赏植物，起源于印度尼西亚。目前为止，共发现了6种锦紫苏类病毒，分别命名为锦紫苏类病毒-1～锦紫苏类病毒-6(*Coleus blumei viroid*-1～*Coleus blumei viroid*-6，CbVd-1～CbVd-6)[1]。

1 分类及分子特征

6种锦紫苏类病毒均属于马铃薯纺锤形块茎类病毒科 *Pospiviroidae* 锦紫苏类病毒属 *Coleviroid*，其基因组大小各不相同，在248～364 nt之间[1]（表1），能折叠成由一系列短的茎环组成的棒状二级结构(图1)，具有相同的中央保守区(central conserved region，CCR)。如图1所示，锦紫苏类病毒间存在明显的重组现象，二级结构中，CbVd-1的左半部分与CbVd-4的左半部分相同；CbVd-2的左半部分与CbVd-3、CbVd-6的左半部分相同；而CbVd-1与CbVd-2，CbVd-3与CbVd-4，CbVd-5与CbVd-6的右半部分分别相同。因此，从二级结构位置上而言，CbVd-2与CbVd-4是左右部分相反的两个嵌合体，

收稿日期： 2020－06－22 **修订日期：** 2020－07－14
基金项目： 国家自然科学基金(31701756)
* 通信作者 E-mail：sfli@ippcaas.cn



相同方框代表不同类病毒之间的相似部分

Elements that are shared by different viroids are marked in the same boxes

图1 CbVd-1~CbVd-6代表性分离物的核酸序列及其二级结构示意图

Fig.1 Nucleotide sequences and the predicted secondary structure of representative isolates of CbVd-1—CbVd-6

多个锦紫苏类病毒嵌合体的发现为类病毒分子间重组提供了直接确凿的分子遗传学证据[2-3]。

表 1　锦紫苏类病毒的基因组大小及地理分布

Table 1　Genome sizes and distribution of coleus viroids

类病毒 Viroid	基因组大小/nt Genome size	分布 Distribution
CbVd-1	248～251	巴西[4],德国[5],加拿大[6],日本[7],中国[8],韩国[9],印度[10],马来西亚[11],克罗地亚[12]
CbVd-2	301	德国[2],中国[13]
CbVd-3	359～364	德国[14],中国[15],克罗地亚[12]
CbVd-4	295	德国[2]
CbVd-5	274	中国[16],印度[17],印度尼西亚[17],日本[18],加拿大[19]
CbVd-6	340～343	中国[3],加拿大[20]

2　发现及分布

1981 年,Fonseca 等从巴西的市售黄色锦紫苏中发现了 CbVd-1[4],这是第一个被发现的锦紫苏类病毒;1990 年,Spieker 等首次报道了 CbVd-1 的全序列[5]。随后,世界上很多国家包括加拿大、日本、中国、韩国、印度、马来西亚、克罗地亚等,陆续对 CbVd-1 在该国的首次发现进行了报道[6-12]。1996 年,德国科学家首次报道了 CbVd-2[2],它是第一个被发现的自然界中存在的类病毒嵌合体,除德国之外,中国也报道了此类病毒[13]。1991 年,德国科学家首次报道了 CbVd-3[14],中国[15]和克罗地亚[12]也相继报道了此类病毒。CbVd-4 是 1996 年德国科学家人工构建的已被证明具有生物学活性的嵌合体,目前未在自然寄主中发现[2]。CbVd-5[16]和 CbVd-6[3]是中国科学家报道的两个类病毒新种,自 2009 年首次报道以来,印度和印度尼西亚的锦紫苏样品中也发现了 CbVd-5[17];随后,日本的锦紫苏样品中也发现了 CbVd-5[18];2018 年,加拿大学者从市售锦紫苏样品中检测到了 CbVd-5 和 CbVd-6,并进一步验证了 CbVd-1 普遍存在于加拿大市售的不同品种锦紫苏中[19-20]。由此可见,目前除 CbVd-4 未在自然寄主中发现以外,其他 5 种锦紫苏类病毒均存在于自然寄主锦紫苏中,且分布越来越广泛(表 1)。

3　检测方法

类病毒检测主要使用生物学和分子生物学方法[1]。生物学接种检测法根据类病毒在指示植物上的特有症状来判断待检类病毒的种类,是一种敏感和方便的方法,但由于锦紫苏类病毒尚未找到合适的鉴别寄主,因此,目前锦紫苏类病毒的检测方法主要是分子生物学检测法。可用于类病毒检测的分子生物学法包括聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、核酸杂交法、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、基因芯片及高通量测序技术等,这些方法均可应用于锦紫苏类病毒的检测[1]。Fonseca 利用 PAGE 方法首次从锦紫苏中发现了类病毒[4];Spieker 等利用核酸杂交及 RT-PCR 等方法从锦紫苏中鉴定了 CbVd-2 和 CbVd-3[2, 14];苏前富等利用 PAGE、RT-PCR 和核酸杂交的方法对中国锦紫苏样品中的 CbVd-1 进行了检测[21];Hou 等利用 PAGE、RT-PCR 和核酸杂交方法首次发现了 CbVd-5 和 CbVd-6[3, 16]。Zhang 等制备了灵敏度和特异性稳定的基因芯片,可以实现包括 6 种锦紫苏类病毒在内的多种类病毒的高通量检测[22]。Jiang 等利用小 RNA(sRNA)测序技术对锦紫苏中的 sRNA 进行了测定并利用生物学软件对其中类病毒来源的 sRNA(vd-sRNA)进行组装,建立了利用 sRNA 测序技术鉴定锦紫苏类病毒的方法,该方法特别适用于锦紫苏中含量低及未知的类病毒[23]。

RT-PCR 和核酸杂交法是目前应用较多的类病毒检测方法,传统意义上,一对引物或一种特异探针只能检测一种类病毒。由于目前为止发现的 6 种锦紫苏类病毒具有共同的 CCR,而且部分序列相同,因此,理论上,利用 CCR 的核酸序列制备的引物或探针能够检测全部具有该序列的类病毒。Jiang 等根据锦紫苏类病毒 CCR 部分序列设计了针对该属类病毒的通用引物[24],直接从锦紫苏茎部和叶片中吸取汁液作为 cDNA 合成的模板,一次 RT-PCR 就可以同时扩增出至少 3 种锦紫苏类病毒。另外,Jiang 等还将锦紫苏类病毒 CCR 的部分序列扩增 8 倍,制备了 8CCR 探针,该探针可以通过一次杂交同时检测多种锦紫苏类病毒[25]。以上两种快速检测锦紫苏类病毒的方法灵敏度高、简单快速、成本低,是快速准确地检测锦紫苏类病毒的有效方法。锦紫苏类病毒分子间具有高效重组的特性,而重组可能会产生新的类病毒种,若它们之间具有共同的 CCR,以上两种锦紫苏类病毒的快速检测方法将会检测到这些可能存在的未知类病毒新种。另外,迄今为止,很多国家已经报道了 CbVd-1,然而,其他 5 种锦紫苏类病毒(CbVd-2～CbVd-6)的相关报道还比较少,快速检测方法的建立将有助于调查锦紫苏类病毒的发生分布情况。

4　与寄主互作

目前为止,锦紫苏类病毒的自然寄主仅有锦紫苏

Coleus blumei，但通过人工接种，CbVd-1 可以侵染留兰香 *Mentha spicata*、野薄荷 *M. arvensis* var. *piperascens*、香蜂花 *Melissa officinalis*、罗勒 *Ocimum basilicum* 及圣罗勒 *O. sanctum* 等[6-7]。通常，锦紫苏类病毒的侵染不引起明显的症状，但有研究表明，CbVd-1 在一些锦紫苏品种上可引起矮化、斑驳等症状[4, 6, 9, 26]。

迄今为止，锦紫苏类病毒与寄主的互作机制尚未明确，研究表明：与其他类病毒一样，自然界中锦紫苏类病毒以准种模式存在，这种模式的形成具有多种影响因素。利用侵染性克隆技术及生物学接种方法证实了锦紫苏类病毒的基因多样性不仅取决于侵染寄主的选择压力，也取决定于类病毒本身的性质，是寄主与类病毒相互作用的结果[27]。另外，sRNA 介导的基因沉默是植物的一种很有效的抗病毒方式，锦紫苏中也存在类似的机制。分析锦紫苏类病毒来源的 sRNA，发现锦紫苏类病毒的 sRNA 的大小主要为 22 nt，说明锦紫苏中 Dicer-like 2(DCL2)蛋白在 sRNA 产生过程中发挥重要作用[23]。研究还发现，CCR 部分序列为 DCL 蛋白切割热点，暗示 CCR 在锦紫苏类病毒与寄主互作过程中可能发挥重要作用[23]。

5 传播方式

通过种子进行传播是病毒远距离传播的重要途径，也是病毒性病害流行的重要因素之一。随着锦紫苏类病毒在世界各国的相继报道，其种传相关问题也日益受到学者的关注。研究表明：CbVd-1 可以通过种子传播，如在加拿大，根据品种和来源的不同，市售锦紫苏种子中 CbVd-1 的侵染率为 16%～68%[6]；在某些品种的锦紫苏上，CbVd-1 的种传率甚至可以高达 100%[9]。近期研究表明，CbVd-1 能否种传与其第 25 位核苷酸密切相关，该核苷酸位于 CbVd-1 二级结构的 loop5 中[28]。另外，CbVd-5 和 CbVd-6 也可以通过种子进行传播[27]，但其分子机制有待进一步研究。另外，锦紫苏类病毒还可通过机械摩擦或嫁接的方式进行传播[1, 6, 9]。

6 总结与展望

目前锦紫苏中共发现了 6 种类病毒，多数情况下，锦紫苏类病毒在寄主上不引起明显的病害症状，但由于锦紫苏类病毒的寄主范围和病害症状尚未明确，其检验检疫和防治不能忽视。已经发现的锦紫苏类病毒存在广泛的分子间重组现象，且具有共同的中央保守区，基于中央保守区序列建立的快速检测方法对相关类病毒新种的发现和检验检疫具有重要意义，对其他类病毒乃至病毒快速检测方法的建立也具有重要的参考作用。

锦紫苏类病毒的重组规律和机制是今后的研究重点和难点。目前人工接种锦紫苏类病毒侵染的时间较长，且寄主品种有限。因此，寻找适宜寄主和缩短锦紫苏类病毒复制研究周期的方法十分关键。对锦紫苏类病毒重组机理的深入研究可为进一步研究类病毒乃至 RNA 病毒的重组机理、进化和流行规律具有重要意义。

参考文献

[1] HADIDI A, FLORES R, RANDLES J W, et al. Viroids and satellites [M]. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2017.

[2] SPIEKER R L. *In vitro*-generated 'inverse' chimeric *Coleus blumei* viroids evolve *in vivo* into infectious RNA replicons [J]. Journal of General Virology, 1996, 77(11): 2839-2846.

[3] HOU Wanying, LI Shifang, WU Zujian, et al. *Coleus blumei viroid* 6: a new tentative member of the genus *Coleviroid* derived from natural genome shuffling [J]. Archives of Virology, 2009, 154(6): 993-997.

[4] FONSECA M E N. A viroid from *Coleus* species in Brazil [J]. Plant Disease, 1990, 74(1): 80.

[5] SPIEKER R L, HAAS B, CHARNG Y C, et al. Primary and secondary structure of a new viroid "species" (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue' [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(13): 3998.

[6] SINGH R P, BOUCHER A. High incidence of transmission and occurrence of viroid in commercial seeds of *Coleus* in Canada [J]. Plant Disease, 1991, 75(2): 184-187.

[7] ISHIGURO A, SANO T, HARADA Y. Nucleotide sequence and host range of a coleus viroid isolated from coleus (*Coleus blumei* Benth) in Japan [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1996, 62(1): 84-86.

[8] LI Shifang, SU Qianfu, GUO Rui, et al. First report of *Coleus blumei viroid* from coleus in China [J]. Plant Pathology, 2006, 55: 565.

[9] CHUNG B M, CHOI G S. Incidence of *Coleus blumei viroid* 1 in seeds of commercial coleus in Korea [J]. The Plant Pathology Journal, 2008, 24(3): 305-308.

[10] ADKAR-PURUSHOTHAMA C R. First report of *Coleus blumei viroid* infecting coleus in India [J]. Plant Disease, 2013, 97(1): 149.

[11] ROSLAN N N C, THANARAJOO S S, KADIR J, et al. First report of *Coleus blumei viroid* in Malaysia [J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 99(3): 800.

[12] ŠKORIĆ D, ČERNI S, JEZERNIK K, et al. Molecular characterization of *Coleus blumei viroids* 1 and 3 in *Plectranthus scutellarioides* in Croatia [J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155: 731-742.

（下转 39 页）

[29] RALSTON L, KWON S T, SCHOENBECK M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 393(2): 222 - 235.

[30] DIXON R A. Natural products and plant disease resistance [J]. Nature, 2001, 411(6839): 843 - 847.

[31] WHITEHEAD L M, THRELFAL D R, EWING D F. 5-*epi*-aristolochene is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol [J]. Phytochemistry, 1989, 28(3): 775 - 779.

[32] GAO Yang, HONZATKO R, PETERS R. Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis [J]. Natural product reports, 2012, 29:1153 - 1175.

[33] PECHOUS S W, WHITAKER B D. Cloning and functional expression of an (E, E)-alpha-farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit [J]. Planta, 2004, 219(1): 84 - 94.

[34] ROWAN D D, HUNT M B, FIELDER S, et al. Conjugated triene oxidation products of alpha-farnesene induce symptoms of superficial scald on stored apples [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(6): 2780 - 2787.

[35] CHOI D, WARD B L, BOSTOCK R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. Plant Cell, 1992, 4(10): 1333 - 1344.

[36] PERRONE S T, MCDONALD K L, SUTHERLAND M W, et al. Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2003, 62(3): 127 - 135.

[37] ARACELI A C, ELDA C M, EDMUNDO L G, et al. Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2007, 70(1 - 3): 69 - 76.

[38] LIU Mengjie, KHAN N U, WANG Ningbo, et al. The Protein elicitor PevD1 enhances resistance to pathogens and promotes growth in *Arabidopsis* [J]. International journal of biological sciences, 2016, 12(8): 931 - 943.

(责任编辑:田　喆)

(上接 30 页)

[13] FU Fanghong, LI Shifang, JIANG Dongmei, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 2 from commercial coleus in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(4): 494.

[14] SPIEKER R L, MARINKOVIC S, SANGER H L. A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 3 from the *Coleus blumei* cultivar 'Fairway Ruby' [J]. Archives of Virology, 1996, 141(8): 1377 - 1386.

[15] JIANG Dongmei, LI Shifang, FU Fanghong, et al. First reported occurrence of *Coleus blumei viroid* 3 in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93(4): 82.

[16] HOU Wanying, SANO T, LI Shifang, et al. Identification and characterization of a new *Coleviroid* (CbVd-5) [J]. Archives of Virology, 2009, 154: 315 - 320.

[17] JIANG Dongmei, LI Shifang, FU Fanghong, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 5 from *Coleus blumei* in India and Indonesia [J]. Plant Disease, 2013, 97(4): 561.

[18] TSUSHIMA T, SANO T. First report of *Coleus blumei viroid* 5 infection in vegetatively propagated clonal coleus cv. 'Aurora black cherry' in Japan [J]. New Disease Reports, 2015, 32: 7.

[19] SMITH R L, LAWRENCE J, SHUKLA M, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 5 and molecular confirmation of *Coleus blumei viroid* 1 in commercial *Coleus blumei* in Canada [J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1862.

[20] SMITH R L, LAWRENCE J, SHUKLA M, et al. Occurrence of *Coleus blumei viroid* 6 in commercial *Coleus blumei* in Canada-The first report outside of China [J]. Plant Disease, 2019, 103: 782.

[21] 苏前富,郭瑞,成卓敏,等. 中国锦紫苏类病毒的检测及其分子生物学特征研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 226 - 231.

[22] ZHANG Yongjiang, YIN Jun, JIANG Dongmei, et al. Universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64474. DOI: 10.1371/journal.pone.0064474.

[23] JIANG Dongmei, WANG Meng, ZHANG Zhixiang, et al. High-throughput sequencing analysis of small RNAs derived from *Coleus blumei* viroids [J/OL]. Viruses, 2019, 11(7): 619. DOI:10.3390/v11070619.

[24] JIANG Dongmei, WU Zujian, XIE Lianhui, et al. Sap-direct RT-PCR for the rapid detection of *Coleus blumei* viroids of the genus *Coleviroid* from natural host plants [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 174(1 - 2): 123 - 127.

[25] JIANG Dongmei, HOU Wanying, SANO T, et al. Rapid detection and identification of viroids in the genus *Coleviroid* using a universal probe [J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(2): 321 - 326.

[26] SPIEKER R L. A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 1 from the *Coleus blumei* cultivar "Rainbow Gold" [J]. Archives of Virology, 1996, 141(11): 2153 - 2161.

[27] JIANG Dongmei, GAO Rui, QIN Lü, et al. Infectious cDNA clones of four viroids in *Coleus blumei* and molecular characterization of their progeny [J]. Virus Research, 2014, 180: 97 - 101.

[28] TSUSHIMA T, SANO T. A point-mutation of *Coleus blumei viroid* 1 switches the potential to transmit through seed [J]. Journal of General Virology, 2018, 99(3): 393 - 401.

(责任编辑:田　喆)