

广东地区两种兰花病毒病害的分子鉴定及检测

周国辉^{1**}, 陈晓琴¹, 李梅辉², 周洁浪³, 唐添华³,冯盛祥³, 郭丽晶³, 张 旺³

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642; 2. 广东省植物保护总站, 广东广州 510500; 3. 广东省顺德农业局, 广东顺德 528333)

Identification and Detection of Two Major Viruses Infecting Orchids

by Molecular Technique

Zhou Guo-hui¹, Chen Xiao-qin¹, Li Mei-hui², Zhou Jie-lang³, Tang Tian-hua³, Feng Sheng-xiang³,
Guo Li-jing³, Zhang Wang³

(1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. General Station of Plant Protection, Agricultural Department of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China; 3. Agricultural Bureau of Shunde, Shunde 528333, China)

Abstract: Based on reported *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) genomic cDNA sequences, two pairs of PCR primers for viral coat protein gene with expected amplified sizes of 784bp and 604bp were designed respectively, and RT-PCR was performed with the total RNA as templates extracted from diseased orchid plants (*Cymbidium sinense* var. *margicoloratum* and *Oncidium* sp.) collected from Shunde, Guangdong province, China. Five amplified DNA fragments with expected sizes were cloned and sequenced. Although the nucleotide sequences of DNA fragments amplified from different orchid species or different farms with CyMV primer showed slightly diversity, they had highly homology to *cp* gene of CyMV isolates around the world. Otherwise, the nucleotide sequences of the two DNA fragments amplified from different orchid species with ORSV primer were completely identity and highly homologous to *cp* gene of ORSV isolates around the world. Therefore the two viruses infecting orchids in Guangdong were identified as CyMV and ORSV. Simultaneous detection of the two orchid viruses by dual RT-PCR was conducted with primers mixture. Out of the 153 samples collected from 23 farms, 76 tested positive for CyMV, 52 positive for ORSV and 2 positive for both CyMV and ORSV.

Key words: *Cymbidium mosaic virus*; *Odontoglossum ringspot virus*; Coat protein gene; Virus detection

摘要: 根据已报道的建兰花叶病毒 (CyMV) 和齿兰环斑病毒 (ORSV) 基因组核苷酸序列, 在其 *cp* 基因上下游设计 PCR 引物。CyMV 预计扩增产物 784bp, ORSV 预计扩增产物 604bp。以采集自广东省顺德的墨兰和文心兰表现病毒病症状的病株叶组织总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。对预期大小的 5 个扩增产物进行克隆和测序, 结果表明, 来源于不同兰种或同一兰种不同兰场的病样 CyMV 引物扩增产物核苷酸序列存在少量差异, 但均与世界各地的 CyMV 分离物 *cp* 基因高度同源; 而来源于不同兰种的病样 ORSV 引物扩增产物核苷酸序列完全相同, 与世界各地的 ORSV 分离物 *cp* 基因高度同源。因此可将侵染广东兰花的两种病毒鉴定为 CyMV 和 ORSV。混合上述两种病毒的 PCR 引物, 采用双重 RT-PCR 扩增, 对采自广东顺德 23 个兰场共 153 份样品进行病毒检测, 76

收稿日期: 2003-09-24, 修回日期: 2003-12-08

** 通讯作者: 周国辉 (1963-), 男, 安徽省籍, 副教授, 博士, 研究方向为植物病毒及病毒病害。
Corresponding author. Tel: 020-85280306, E-mail: ghzhou@scau.edu.cn

份 (49.7%) 检出 CyMV, 52 份 (34.0%) 检出 ORSV, 2 份 (1.3%) 同时检出 CyMV 和 ORSV。

关键词: 建兰花叶病毒, 齿兰环斑病毒, 外壳蛋白基因, 病毒检测

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0149-04

病毒病是兰花上的主要病害之一, 在叶片上形成褪绿条纹、凹陷的灰白斑或坏死圈斑等症状, 导致植株生长不良、开花小而少, 花期缩短, 发病植株观赏价值大为下降。侵染兰花的病毒至少有 25 种, 其中分布最广、为害最重的是建兰花叶病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CyMV) 和齿兰环斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) [1-3]。自 1980 年代起, 有关侵染我国各地兰花的 CyMV 和 ORSV 的研究陆续有报道, 主要工作集中在病毒鉴定[4-7]、血清学检测方法等[3,8], 对病毒分子生物学的研究仅见于 CyMV[9,10]。本研究采用分子生物学手段对侵染广东顺德兰花的 CyMV 和 ORSV 进行快速鉴定, 克隆和序列分析了这两种病毒的外壳蛋白基因, 并建立了同时检测两种病毒的双重 RT-PCR 技术。

1 材料与方 法

1.1 兰花样品来源

2003 年 7~8 月间, 从广东省兰花主产地顺德市不同类型的兰场采集可疑发病兰株。兰花品种包括文心兰 (*Oncidium sp.*)、金嘴墨兰 (*C. sinense var. margicoloratum cv. Jin Zui*)、企黑墨兰 (*C. sinense var. margicoloratum cv. Qi Hei*)、银边建兰 (*C. ensifolium var. ensifolium cv. Yin Bian*) 及小桃红建兰 (*C. ensifolium cv. Xiao Tao Hong*)。症状包括轻微黄化、凹陷灰白斑、褪绿圈斑及黄色条斑等。

1.2 引物设计与合成

查询 GenBank 数据库中已报道的 CyMV 及 ORSV 基因组序列, 在病毒外壳蛋白 (Coat Protein, CP) 基因 (*cp*) 上、下游寻找保守序列, 根据保守序列设计 PCR 引物。CyMV 上、下游引物为 P_{CyMV1}: 5'-cctggcgagggttaagttac-3' 和 P_{CyMV2}: 5'-gccagtagtgaaacaa act-3', 设计扩增产物 784bp。ORSV 上、下游引物为 P_{ORSV1}: 5'-gtggttgtaatggtgttag-3' 和 P_{ORSV2}: 5'-cacc acggatagttcaacac-3', 设计扩增产物 604bp。两对引物均包含各自病毒完整的 *cp* 基因及其部分上下游序列。引物由宝(大连)生物工程公司合成。

1.3 兰花叶组织总 RNA 抽提

取兰花幼嫩叶片 50mg, 液氮下研成粉状, 采用华美(洛阳)生物工程公司总 RNA 分离试剂盒(I)抽提总 RNA, 抽提产物溶于 50μL 双蒸水中, -20℃ 贮存备用。

1.4 RT-PCR、产物回收及克隆测序

RT-PCR 反应采用宝生物工程(大连)有限公司 one step RNA PCR kit(AMV)进行, 反应体系参照试剂盒说明, 反应程序为: 45℃ 反转录 30min; 94℃ 2 min 灭活反转录酶; 94℃ 0.5min, 55℃ 0.5min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。反应产物常规方法电泳, 根据分子量大小判断目的片段。采用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)切胶回收目的 DNA 分子, 克隆于 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌, 交由宝(大连)生物工程技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 CyMV 的分子鉴定及 *cp* 基因序列分析

用所设计的 CyMV PCR 引物进行 RT-PCR 反应, 能够成功地在部分兰花病样总 RNA 抽提物中扩增到与预期大小(784bp)相符的单一明亮的 DNA 电泳条带。选取文心兰、金嘴墨兰和企黑墨兰 RT-PCR 扩增产物各一个, 代号分别为 CyMV-gd1、CyMV-gd2、CyMV-gd3, 进行克隆和序列测定。结果现示, 三者均含有一个大小为 672bp 的开读框架, 经 GenBank 数据库查询, 该开读框序列与已报道的 CyMV 各分离物 *cp* 基因序列高度同源, 同源率均大于 95%, 因而认定它们为侵染广东兰花的 CyMV 不同分离物的 *cp* 基因。将其输入 GenBank 数据库, 登录号分别为 AY360408、AY360409 和 AY360410。以 gd1 为比较标准, gd2、gd3、海南分离物^[9]及新加坡分离物 2 分别有 18、22、22 和 19 个核苷酸替换, 而南韩分离物和夏威夷分离物(资料来源 GenBank)除分别有 16 和 15 个核苷酸替换外, 还分别有 9 个核苷酸缺失和 1 个核苷酸插入。

根据 *cp* 基因的核苷酸序列, 采用 MEGA2 软件对所获得的 CyMV 三个分离物及已报道的主要分离物进行进化树分析, 可得 CyMV 几个分离物之间的亲缘关系图(图 1), 由图 1 可知, 分离物之间的亲缘关系与其地理位置大体相关, 欧洲法国各分离物以很高的相似系数聚集在一起, 亚洲各分离物(包括美国夏威夷分离物)也集成一大类, 新加坡的一个分离物和泰国分离物是特例, 它们与法国各分离物关系较近, 也许是由于兰花种苗远距离调运的结果。本研究获得的三个分离物中 gd1 与 gd3 关

系很近, *cp* 基因序列同源率为 97.3%; 而另一分离物 *gd2* 关系相对较远, 值得注意的是, *gd1*、*gd3* 分离物的寄主为不同的属, 前者寄主为文心兰, 后者寄主为墨兰, 但两者采集地点很接近, 都位于广东顺德陈村镇; *gd2* 分离物寄主也为墨兰, 但采集地点位于广东顺德伦教镇。分离物之间亲缘关系的分析揭示了这样一个现象: 即 *CyMV* 存在一定的分化, 是一个多样性的群体, 这种分化主要是由于地理隔离所造成的, 而与寄主种属关系不大。

2.2 ORSV 的分子鉴定及 *cp* 基因序列分析

采用所设计的 ORSV PCR 引物, 对供试的兰花样品总 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 结果在部分样品中产生了与预期大小 (604bp) 相符的单一明亮的 DNA 电泳条带。选取金嘴墨兰和企黑墨兰 RT-PCR 扩增产物各一个, 进行克隆和序列测定。结果表明两者序列完全相同, 均含有一个大小为 477bp 的开读框架, 经 GenBank 数据库查询, 该开读框序列与已报道的 ORSV 各分离物 *cp* 基因序列高度同源(见表 1), 因而认定它们为侵染广东兰花的 ORSV 的 *cp* 基因, 代号为 ORSV-gd, 将其输入 GenBank 数据库, 登录号为 AY360407。

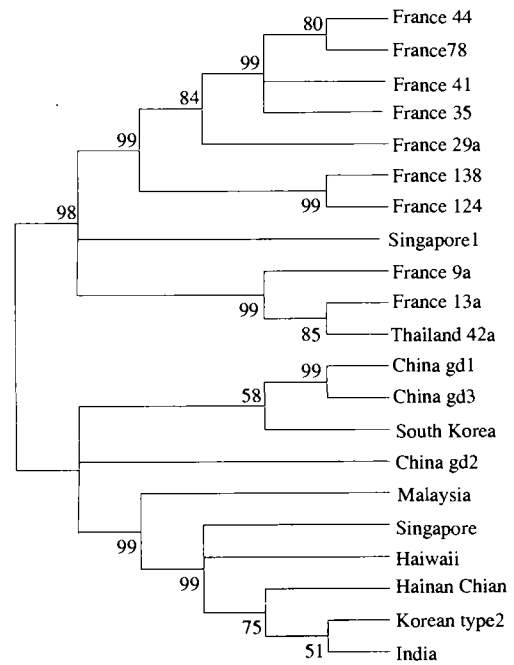


图 1 *CyMV* 主要分离物外壳蛋白基因序列聚类图
Fig. 1 Phylogenetic tree of the coat protein gene sequences of some available *CyMV* isolates

表 1 ORSV-gd 与 ORSV 各分离物 *cp* 基因核苷酸及其推导多肽氨基酸同源率

Table 1 *cp* gene nucleotide and deduced amino acid sequences identities of several ORSV isolates with ORSV-gd

Strains/isolates	Geographical origin	Isolated from	GenBank accession no.	Nucleotide homology(%)	Deduced amino acid homology(%)
India	India	<i>Cymbidium</i> sp.	AJ564563	100(477/477)	100(158/158)
CR Strain	Korea	<i>Cymbidium</i> sp.	AF033848	100(477/477)	100(158/158)
Brazil	Brazil	unknown	AF515606	100(477/477)	100(158/158)
OrR6	unknown	<i>Cymbidium</i> sp.	U89894	100(477/477)	100(158/158)
853	Germany	unknown	AJ429094	99.8(476/477)	100(158/158)
Singapore1	Singapore	<i>Spathoglottis</i> sp.	U34586	99.6(476/477)	100(158/158)
2243a	Germany	unknown	AJ429093	99.6(476/477)	99.4(157/158)
Le 98-745	Germany	unknown	AJ429092	99.6(475/477)	99.4(157/158)
Japan	Japan	<i>Cymbidium</i> sp.	X55296	99.6(475/477)	99.4(157/158)
Cy-1 Strain	unknown	<i>Cymbidium</i> sp.	S83257	99.6(475/477)	99.4(157/158)
O Strain	USA	unknown	AF141927	99.4(474/477)	100(158/158)
Cy Strain	Korea	<i>Cymbidium</i> sp.	X78966	98.5(470/477)	97.5(154/158)
OrK9	Korea	<i>Cymbidium</i> sp.	Nc_001728	98.3(469/477)	96.8(153/158)
DSMV PV-130	Germany	Unknown	AJ429091	97.3(464/477)	96.2(152/158)

由表 1 可知, ORSV 各分离物 *cp* 基因序列非常保守。不但广东顺德不同兰场不同墨兰品种上获得的 2 个 ORSV *cp* 基因序列完全相同, 而且它们与已报道的世界各地的 ORSV 各分离物 *cp* 基因之间也高度同源, 广东分离物 *cp* 基因与其中的多个完全相同,

与许多仅存在 1-2 个核苷酸的差异, 差异最大的德国分离物也仅存在 13 个核苷酸代换, 由其推导的外壳蛋白仅存在 6 个氨基酸的差异。

值得指出的是, 在本研究所克隆的 DNA 片段中, 除包含 ORSV *cp* 基因外, 其上游序列中还具有

一个终止密码子 TGA, 在该终止密码子与 *cp* 基因起启密码之间存在两个核苷酸的间隔, 这一情况完全符合 ORSV 基因组结构特征。

2.3 双重 RT-PCR 检测兰花叶组织内 CyMV 和 ORSV

CyMV 和 ORSV 两对 PCR 引物按等量混合后, 对兰花样品总 RNA 进行双重 RT-PCR, 电泳结果表明, 在单一病毒感染的样品中, 扩增产物仍然呈单一明亮的电泳条带, 根据条带的大小可以判断所检出的病毒种类; 而在混合感染的样品中, 扩增产物呈两条明亮的电泳条带 (图 2)。由此证实采用双重 RT-PCR 能够同时检测 CyMV 和 ORSV。

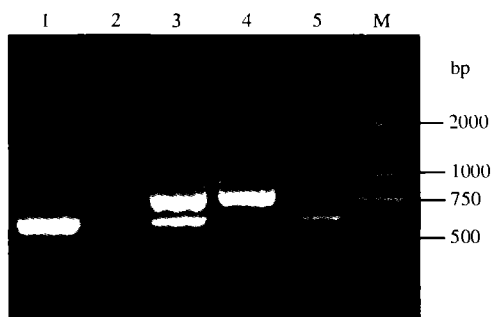


图 2 双重 RT-PCR 同时检测兰花 CyMV 和 ORSV 产物电泳结果

Fig. 2 Results of simultaneous amplification of CyMV and ORSV by dual RT-PCR

Lane 1/5. ORSV infected; 2. Negative sample; 3. CyMV and ORSV infected; 4. CyMV infected; M. DNA marker.

对采自广东顺德 23 个兰场共 153 份样品进行病毒检测, 结果在所有兰场及全部 5 个种属的兰花中均检出了 CyMV 和 ORSV。其中有症样品 126 份, 71 份(56.3%)检出 CyMV, 51 份(40.5%)检出 ORSV, 其中 2 份同时检出 CyMV 和 ORSV; 6 份有症样品未能检出上述两种病毒, 可能是该方法存在一定程度的漏检问题, 更有可能是受到其它病毒的侵染。无症状样品 27 份, 6 份检出 CyMV, 1 份检出 ORSV。

3 讨论

通过基因序列分析对植物病毒进行鉴定, 是近十多年发展起来的鉴定植物病毒的新方法^[11,12], 具有快速、准确、简便等特点, 还能为病毒亲缘关系的研究提供信息。本研究在症状调查及前人工作基础上, 通过特异引物 RT-PCR 及其产物克隆、序列分析, 成功地对广东省顺德市兰花上的 CyMV、ORSV 进行了鉴定。不但明确了 CyMV 和 ORSV 是

侵染广东顺德兰花的主要病毒病原, 而且明确了前者存在一定程度的多样性, 而后者相对保守, 这对抗病育种及防治对策的研究具有指导意义。

同时检测两种或多种病毒的双重或多重 PCR (RT-PCR) 技术已有多个成功的报道^[13], 该项技术的关键是要选用合适的引物, 在保证引物特异性的前提下, 避免引物之间的互作干扰。本研究成功地建立了同时检测兰花两种主要病毒的一步法 RT-PCR 技术, 该技术具有操作简便、试剂易得及成本较为低廉的优点, 同时一步法 RT-PCR 有效地减少了操作过程中造成样品交叉污染的可能性。

侵染兰花的病毒还有其他种类^[1,2], 本研究只对其中的 CyMV 和 ORSV 进行了研究, 研究结果也显示部分表现明显病毒病症状的样品不能检出这两种病毒, 至于这些症状是否由其他病毒引起, 是由何种病毒引起, 有关研究正在进行中。

参考文献

- [1] Zettler FW, Ko N-J, Wisler G C, *et al.* Viruses of orchids and their control[J]. *Plant Dis*, 1990, 74(9): 621-626.
- [2] Hu J S, Ferreira S, Wang M, *et al.* Detection of cymbidium mosaic virus, dactyloctenium ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii[J]. *Plant Dis*, 1993, 77: 464-468.
- [3] 肖火根, 郑冠标, 张曙光, 等. 广东兰花病毒病的鉴定和检测研究[J]. *华南农业大学学报*, 1996, 17(1): 21-24.
- [4] 朱本明, 陈作义, 张健如. 上海地区三种花卉病毒[J]. *自然杂志*, 1983, (8): 639.
- [5] 沈淑琳, 王树琴, 朱水芳, 等. 我国兰花主要病毒—建兰花叶病毒和齿兰花环斑病毒的分离和鉴定[J]. *植物检疫研究报告*, 1990, (3): 1-12.
- [6] 刘志昕, 潘俊松, 郑学勤. 侵染兰花的齿兰环斑病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. *热带作物学报*, 1994, 15(增刊): 41-48.
- [7] 李梅, 明艳林, 陈青, 等. 蝴蝶兰病毒病的病原鉴定[J]. *福建农业科技*, 2001, (6): 11-12.
- [8] 郑平, 刘荣维, 徐明全, 等. 国内两种主要兰花病毒病的综合普查研究[J]. *广东农业科学*, 2001, 6: 37-40.
- [9] 潘俊松, 刘志昕, 吴豪, 等. 建兰花叶病毒外壳蛋白基因序列分析及病毒检测[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 325-328.
- [10] 刘志昕, 吴豪, 潘俊松, 等. 建兰花叶病毒运动蛋白基因克隆及序列分析[J]. *中国病毒学*, 16(1): 51-54.
- [11] 陈炯, 郑红英, 程晔, 等. 豇豆病毒病原的分子鉴定[J]. *病毒学报*, 2001, 17(4): 368-371.
- [12] 郑滔, 陈炯, 陈剑平. 杭州郊区菜豆花叶病病原的分子鉴定[J]. *浙江农业学报*, 2002, 14(3): 178-181.
- [13] Nie X-Z, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 86: 179-185.