

浙江榨菜病毒病病原鉴定

施曼玲

(杭州师范学院生命科学学院 杭州 310012)

摘要: 从浙江桐乡和海宁的花叶或叶片皱缩、植株矮化的榨菜 (*Brassica juncea* Coss) 上分离毒源, 摩擦接种 5 种鉴别寄主, 在鉴别寄主上都出现不同症状; 间接酶联免疫吸附法 (Indirect ELISA) 检测, 芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 的检出率为 87.5%, 黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 为 73.08%, 两者复合侵染率为 65.38%, 所有的样本都没有检测到烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV); IC-RT-PCR 扩增, 分别得到约 0.85kb 和 0.7kb 的两条条带, 与预期的 TuMV 和 CMV 的 CP 基因大小吻合。CP 基因序列测定也表明: 所克隆产物是属于 TuMV 和 CMV 的 CP 基因。根据以上试验结果判断: 浙江榨菜病毒病主要是由 TuMV、CMV 以及 TuMV 和 CMV 复合侵染引起。

关键词: 榨菜, 芜菁花叶病毒, 黄瓜花叶病毒, 病毒病

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0051-05

PATHOGEN IDENTIFICATION OF MOSAIC VIRUS DISEASE OF *BRASSICA JUNCEA* COSS IN ZHEJIANG

SHI Man-Ling

(Coll. Of Life Science, Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310012)

Abstract: The virus isolates were collected from *Brassica juncea* Coss whose symptom was mosaic, stunt and distorted in Tongxiang and Haining, in Zhejiang province. The isolates could infect five identification hosts and produced different symptoms. The results of indirect ELISA test indicated that the specimens infected by *Turnip mosaic virus* (TuMV) accounted for 87.5% of the total. 73.08% and 65.48% of the total specimens were infected by *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) and TuMV + CMV complex, respectively. All specimens didn't infected by *Tobacco mosaic virus* (TMV).

* 浙江省自然科学基金项目 (No. 301007)

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-05-20

There were 0.7kb and 0.85kb special stripe in 1% agrose gel electrophoresis after immunocapture polymerase chain reaction (IC-RT-PCR). All tests results indicated that TuMV, CMV and TuMV + CMV complex were the predominant causal viruses infecting *Brassica juncea* Coss in Zhejiang province.

Key words: *Brassica juncea* Coss, Turnip Mosaic Virus (TuMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Virus disease

榨菜 (*Brassica juncea* Coss) 是我国重要的加工蔬菜之一, 它是一种茎瘤芥菜。榨菜病毒病是危害榨菜生产的主要病害, 据报道侵染榨菜的病毒主要有芜菁花叶病毒 (TuMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和烟草花叶病毒 (TMV) 等^[1,2]。2002 年浙江省榨菜的主要栽培基地桐乡和海宁榨菜病毒病大爆发, 桐乡市 60,000 多亩榨菜中近 30,000 亩感染了由蚜虫传染的病毒病, 估计总产量下降 3,000 多万公斤, 造成经济损失 1,500 万元以上。我们对感病榨菜进行病毒分离, 经生物学、血清学和 IC-RT-PCR 等检测, 证明浙江榨菜病毒病主要是由芜菁花叶病毒 (TuMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 以及两者复合侵染引起。

1 材料与方法

1.1 酶与试剂

所用的 PCR 试剂盒均购自上海 Sangon 生物公司, DNA 分子 Marker 购自 Boehringer Mannheim 公司。琼脂糖和反转录酶为 Promega 公司产品, 常规试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 毒源与抗血清

自然发病的榨菜病株于 2002 年 2 月分别采自浙江桐乡和海宁。TuMV、CMV 和 TMV 抗血清及毒源, 均由浙江大学生物技术研究所以惠赠。碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为 Sigma 产品。

1.3 鉴别寄主反应

鉴别寄主反应按常规汁液摩擦接种方法进行^[3], 鉴别寄主有青菜 (*Brassica chinensis*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)、三生烟 (*Nicotiana tabacum*-Samsun) 和苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)。

1.4 间接酶联免疫吸附法 (Indirect ELISA) 检测

间接 ELISA 法参照文献[4]方法进行。病叶组织用包被液稀释 (1g/10mL), 每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 洗 3 次, 每次 3min。封闭液 (PBST + 5% 脱脂奶) 封闭, 每孔 120 μ L, 37 $^{\circ}$ C 0.5h。加入抗血清 (1:5,000 倍封闭液稀释), 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1.5h。PBST 洗 3 次, 每次 3min。碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG (Sigma), 1:5,000 倍封闭液稀释, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1h。PBST 洗 3 次, 每次 3min。用硝基苯磷酸酯钠盐显色, 室温放置至完全显色后在 550 型酶联免疫测定仪 (BIO-RAD) 上测各孔 405nm 的 OD 值。设健康汁液为阴性对照, 每个处理重复 2 次。本实验中以 P/N > 2.1 作为阳性判断标准。

1.5 IC-RT-PCR (Immunocapture RT-PCR)

1.5.1 cDNA 合成: 采用免疫捕获反转录 PCR (IC-RT-PCR) 方法扩增基因^[5,6], 操作步骤如下: 在 0.5mL 的 PCR 管中加入 100 μ L 用包被缓冲液 1:100 倍稀释的 TuMV 抗血清, 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜, 用 PBS 及 dH₂O 洗涤后, 加入 500 μ L TuMV 病叶研磨液 (用 PBS 研磨), 37 $^{\circ}$ C 吸附 3h, 用 PBS 及 dH₂O 洗涤, 加入 9 μ L dH₂O 和 1 μ L PA 引物, 72 $^{\circ}$ C 处理 2min 后置

冰上, 然后加入 15 μ L cDNA 合成混合液 (5 μ L ddH₂O, 5 μ L 5 \times RT-buffer, 2.5 μ L 100mmol/L DDT, 1.5 μ L 25 mmol/L dNTP 和 1 μ L 反转录酶), 42 $^{\circ}$ C 合成 1h 后, 72 $^{\circ}$ C 处理 10min。按同样的方法合成 CMV 的 cDNA。

1.5.2 PCR 扩增: 根据已发表的 TuMV 和 CMV 基因序列, 设计并合成 CP 基因 特异性引物:

TuMV3' 引物5' - TACAACCTTCATAACCCCTT/GAACGC-3'

5' 引物5' - GCAGATGAAACGCTTGACGCAG-3'

CMV3' 引物5' - TACCCGGGTCAGACTGCTAGCACC-3'

5' 引物5' - ACGTCGACCATGGACAAATC-3'

取 10 μ L 反转录产物为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 循环, 最后一轮循环在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10min。PCR 结束后, 取 10 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳。

1.6 PCR 产物的克隆

将回收的 PCR 产物分别连接到 pGEM-T easy 体上, 连接产物转化 *E.coli* DH5 α , 提取重组质粒, 通过 PCR 扩增和酶切筛选阳性克隆。

1.7 CMV-CP 和 TuMV-CP 基因的序列测定与分析

用 ABI PRISM 3700 DNA 测序仪进行 CP 基因的序列测定。测序结果用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 和 DNA star 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 鉴别寄主的反应

病毒分离物摩擦接种 5 种鉴别寄主, 不同寄主的反应及症状如表 1。鉴别寄主反应是鉴别病毒种类常用的辅助方法。TuMV 一般侵染青菜、苋色藜、心叶烟和三生烟, 而不侵染黄瓜。而 CMV 都可侵染这 5 种作物。根据鉴别寄主的反应, 可初步判断榨菜不止被一种病毒所侵染, 可能受 TuMV 和 CMV 复合侵染。而可能没有受 TMV 的侵染。

表 1 病毒分离物在鉴别寄主上的反应

寄主植物	寄主反应
青菜 (<i>Brassica chinensis</i>)	SM
黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	SM
心叶烟 (<i>Nicotiana glutinosa</i>)	LN、CS
三生烟 (<i>Nicotiana tabacum samsum</i>)	SM、CS
苋色藜 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>)	SM、LN

注: SM 系统花叶, LN 局部坏死斑, CS 局部褪绿斑

2.2 间接酶联免疫吸附测定结果

ELISA 实验结果表明 (见表 2): 104 株样本中有 91 株病叶粗汁液能与 TuMV 抗血清呈阳性反应, 占总样本的 87.5%; 有 76 株病叶粗汁液能与 CMV 抗血清呈阳性反应, 占总样本的 73.08%; 另有 68 株病叶粗汁液都与 CMV 和 TuMV 抗血清呈阳性反应, 占总样本的 65.38%。所有样本的病叶粗汁液与 TMV 抗血清都呈阴性反应。

2.3 IC-RT-PCR 检测

采用 IC-RT-PCR 方法, 合成 TuMV 和 CMV 的 cDNA, 用针对这两种病毒的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 分别得到两条约 0.85kb 和 0.7kb 的 DNA 扩增片段 (见图 1 和图 2), 与预期的 TuMV 和 CMV 的 CP 基因大小相吻合。

表2 榨菜病样中的 TuMV 和 CMV 的 ELISA 检测

分离物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TuMV	0.994	0.262	1.094	1.083	0.119	0.362	0.959	0.861	0.689	0.535
CMV	0.143	0.307	0.433	1.309	0.775	0.288	0.112	0.096	0.466	0.635
分离物	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TuMV	1.318	1.397	0.106	1.061	1.232	0.493	0.876	0.113	1.229	1.375
CMV	1.286	0.160	0.095	0.998	1.078	0.152	0.965	0.102	1.325	1.123
分离物	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TuMV	1.217	0.785	0.893	0.125	1.272	0.488	0.429	0.976	0.640	0.417
CMV	0.908	0.731	0.427	1.162	1.003	0.157	0.149	0.805	0.119	0.488
分离物	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
TuMV	0.133	0.464	0.719	1.408	0.845	0.773	0.129	0.613	1.231	1.087
CMV	0.468	0.709	0.140	1.123	0.465	1.184	0.577	0.136	0.992	0.594
分离物	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
TuMV	1.162	0.099	1.079	0.992	0.770	0.172	0.769	0.584	0.563	0.310
CMV	1.082	0.101	0.935	0.109	0.901	1.151	1.191	0.783	1.152	0.104
分离物	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
TuMV	1.169	1.186	0.376	0.110	1.055	0.855	0.411	0.490	0.880	0.920
CMV	0.892	0.880	0.495	0.837	0.811	0.158	0.145	0.950	0.917	1.043
分离物	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
TuMV	1.055	0.274	0.263	0.167	0.946	1.047	1.159	0.715	0.410	1.002
CMV	0.910	0.119	0.160	0.123	0.777	0.522	1.043	0.303	1.045	1.208
分离物	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
TuMV	0.669	0.596	0.795	0.103	1.071	0.875	0.961	0.784	0.775	1.006
CMV	0.133	0.646	0.961	0.496	1.144	0.775	1.113	0.141	1.322	1.114
分离物	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
TuMV	0.941	0.300	0.114	1.193	0.780	1.155	0.485	0.120	0.419	1.139
CMV	0.773	0.148	0.607	1.045	0.996	0.987	0.931	0.138	0.117	0.715
分离物	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
TuMV	1.118	0.288	0.450	0.405	1.139	0.236	0.655	1.076	0.808	1.049
CMV	1.236	0.143	0.702	0.148	0.783	0.108	0.115	1.178	1.110	0.983
分离物	101	102	103	104	ck					
TuMV	0.820	0.447	1.203	1.066	0.091					
CMV	0.618	0.127	1.108	0.737	0.087					

注：表中 TuMV 和 CMV 的数值指在 405nm 的 OD 值

2.4 CMV-CP 和 TuMV-CP 基因的序列测定

将浙江榨菜的 TuMV 和 CMV 分离物 (TuMV-ZJZC, CMV-ZJZC) 的 CP 基因克隆产物进行测序, 得到 CMV-CP 基因全长 657 个碱基, 编码 218 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列在 NCBI 的 GeneBank 上的登录号为 AJ575589。TuMV-CP 基因全长 874 个碱基, 编码 288 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列在 NCBI 的 GeneBank 上的登录号为 AJ576321。

CMV-ZJZC 的 CP 基因核苷酸及氨基酸序列与 CMV 两个亚组的部分株系进行比较, 结果表明: CMV-ZJZC 的 CP 基因与亚组 I 的 4 个株系有极高的同源性, 与亚组 II 2 株系比较, 则同源性差 (见表 3), 可见 CMV-ZJZC 是属于 CMV 亚组 I。TuMV-ZJZC 的 CP 基因核苷酸及氨基酸序列与 TuMV 别的 5 株系进行比较, 核苷酸序列的同源性为 97.5% ~ 99.2%, 编码的氨基酸序列同源性高达 97.6% ~ 99.4% (见表 4)。

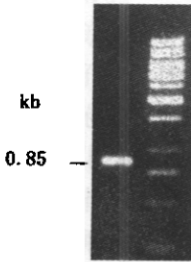


图1 TuMV 的 CP 基因
IC-RT-PCR 扩增产物

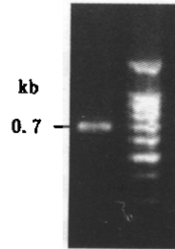


图2 CMV 的 CP 基因
IC-RT-PCR 扩增产物

3 讨论

根据鉴别寄主生物学反应、间接 ELISA 和 IC-RT-PCR 检测结果,可判断引发浙江榨菜病毒病的病毒种类主要有 TuMV 和 CMV,并且绝大多数情况下是两者复合侵染,而没有受到 TMV 的侵染,这与已有的报道不同^[2]。TuMV 和 CMV 是两种重要的作物病毒病原^[7,8],能侵染多种重要的经济作物,尤其在十字花科植物上引起严重危害,给农业生产造成重大损失。TuMV 和 CMV 主要由蚜虫传播,因而苗期防蚜治蚜是防治榨菜

表3 CMV-ZJZC 与 CMV 两亚组株系 CP 基因的
核苷酸和氨基酸序列的同源性

亚组	株系	同源性 (%)		基因库登录号
		核苷酸	氨基酸	
		CMV-ZJZC	CMV-ZJZC	
亚组 I	CMV-Li	93.8	96.8	AY172328
	PE	96.5	97.7	AF268597
	YN	95.1	99.1	AJ239098
	113	94.5	98.6	AF523340
亚组 II	S	57.0	55.1	AF172841
	WL	76.2	79.9	S70105

表4 TuMV-ZJZC 与 TuMV 别的株系 CP 基因的
核苷酸和氨基酸序列的同源性

株系	核苷酸同源性 (%)	氨基酸同源性 (%)	基因库登录号
	TuMV-ZJZC	TuMV-ZJZC	
HOD517J	99.1	99.3	AB076516
ON12J	97.7	99.4	AB076497
SD6	99.2	99.3	AF539412
WENZHO	98.4	98.6	AJ297629
CHN4	97.5	97.6	AB076551

病毒病的关键措施,选育抗 TuMV 和 CMV 品种更是防治榨菜病毒病的根本方法。

在自然界中常见的是 TuMV 和 CMV 复合侵染,Sano 等^[9]研究认为 TuMV 的存在加强了 CMV 在细胞内的累积,并促进了 CMV 的长距离运输,加重了植株的病症。但两者之间相互作用的分子机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 蔡岳松,李新予,余家兰,等.西南农业学报,1991,4(4):99~104.
- [2] 李新予,蔡岳松,王彬,等.中国病毒学,1992,7(3):311~315.
- [3] 田波,裴美云.植物病毒学研究方法.北京:科学出版社,1987.505.
- [4] 尚巧霞,韩成贵,杨莉莉.北京农学院学报,2002,17(2),15~17.
- [5] 施曼玲,李桂新,陶小荣.微生物学通报,2002,29(1):26~30.
- [6] Munford R A, Seal S E. J Virol Methods, 1997, 69: 73~79.
- [7] 刘翔平,路文长.科学通报,1989,34(21):1660~1664.
- [8] Nicolas O, Lalibere J F. J Gen Virol, 1992, 73(9):2785~2793.
- [9] Sino Y, Kojima M, Ann. Phytopath Soc Jap, 1989, 55: 296~302.