

番红花种球中虎眼万年青花叶病毒的分子鉴定与序列分析

廖富荣¹, 林武镇^{1,2}, 陈细红^{1,3}, 陈青¹, 陈红运¹, 黄蓬英¹, 方志鹏¹, 吴媛¹, 沈建国³, 林石明¹

(¹ 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建厦门 361026; ² 生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002;

³ 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福州 350003)

摘要: 【目的】对一批荷兰进境番红花种球 (*Crocus sativus*) 进行病毒鉴定, 以防止危险性病毒传入危害。【方法】根据已报道的马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*) 通用引物 (Sprimer 和 M4T), 采用 RT-PCR 方法对一批番红花种球样品进行检测, 取其中一个 RT-PCR 产物进行克隆测序, 利用 GenBank 上的基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) 和 MEGA 6 中的基于对数期望的多重序列比较 (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, MUSCLE) 进行序列比对分析, 并根据外壳蛋白基因 (coat protein, CP) 序列利用最大似然法 (maximum likelihood method) 进行系统发育分析。【结果】RT-PCR 检测结果显示该批样品扩增到一条约 1.7 kb 的预期大小片段, 说明该批番红花种球样品中存在 *Potyviridae* 科病毒。测序获得长度为 1 666 bp 的序列 (命名为 2677-NL), 含有部分核内含体 b 基因 (nuclear inclusion b, *NIb*)、完整的 CP 和 3'端非编码区 (3'-UTR), 其核苷酸序列与虎眼万年青花叶病毒 (*Ornithogalum mosaic virus*, OrMV) 的 SW3.3 分离物具有最高序列一致性 (99.6%), 与 OrMV 参考基因组序列 (Reference genomic sequences, RefSeq; NC-019409) 的序列一致性为 99.1%。该分离物的 CP 与 6 个 OrMV 印度分离物 (JQ686722、JQ686720、JN692498、JN692497、JN692496、JF682235) 的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 71.5%—77.3% 和 65.7%—79.7%, 与其他 32 个 OrMV 分离物的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 77.9%—99.5% 和 82.9%—99.2%。基于 CP 进行的系统发育分析表明, OrMV 可分为两个类群, 而 2677-NL 与 5 个澳大利亚分离物 (JQ807995、JQ807996、NC-019409、AF185964、AF185965) 相聚成簇, 表明其在系统发育关系上与 OrMV 澳大利亚分离物的亲缘关系最近。【结论】根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 关于 *Potyviridae* 科病毒种类的分类标准, 2677-NL 为 OrMV 的一个分离物, 证实该批番红花种球受到 OrMV 的侵染。这是世界上首次在番红花中发现 OrMV 的报道。

关键词: 虎眼万年青花叶病毒; 番红花; RT-PCR; 新寄主

Molecular Identification and Sequence Analysis of *Ornithogalum mosaic virus* in Saffron (*Crocus sativus*) Corms

LIAO FuRong¹, LIN WuZhen^{1,2}, CHEN XiHong^{1,3}, CHEN Qing¹, CHEN HongYun¹, HUANG PengYing¹,
FANG ZhiPeng¹, WU Yuan¹, SHEN JianGuo³, LIN ShiMing¹

(¹ Inspection and Quarantine Technology Center, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, Fujian;

² Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fuzhou 350002; ³ Inspection and Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350003)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to identify viruses in saffron (*Crocus sativus*) corms imported from the Netherlands and to prevent the entry of dangerous virus into China. 【Method】Using the *Potyviridae* universal primers (Sprimer and M4T), the saffron corms samples were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. After cloning and sequencing of the RT-PCR products, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Multiple Sequence Comparison by

收稿日期: 2017-05-02; 接受日期: 2017-06-25

基金项目: 福建省自然科学基金 (2015J01148)、国家质量监督检验检疫总局科技计划 (2015IK190)、厦门市科技计划 (3502Z20154080)

联系方式: 廖富荣, Tel: 0592-6806943; E-mail: lfr005@163.com。通信作者林石明, Tel: 0592-6803996; E-mail: smlink@163.com

Log-Expectation (MUSCLE) methods were used for multiple sequence alignment. The maximum likelihood method was used to construct the phylogenetic tree according to the coat protein (CP) nucleotide sequences. 【Result】The about 1.7 kb RT-PCR products were amplified from the samples, indicating a member of *Potyviridae* virus was present in the samples of saffron corms. A sequence of 1 666 bp segments was obtained from a positive sample (designated 2677-NL) and it contained a portion of nuclear inclusion b gene (NIb), the complete CP and 3' untranslated region (3'-UTR). This isolate shared the highest nucleotide sequence identity (99.6%) with the SW3.3 isolate of *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV) and shared 99.1% nucleotide sequence identity with the Reference genomic sequences (RefSeq) of OrMV (GenBank accession number: NC_019409). Of those, the CP of the 2677-NL isolate shared 71.5%-77.3% and 65.7%-79.7% nucleotide and amino acid identities, respectively, with those of six OrMV isolates from India (GenBank accession number: JQ686722, JQ686720, JN692498, JN692497, JN692496 and JF682235) whereas 77.9%-99.5% and 82.9%-99.2%, respectively, with the other 32 OrMV isolates. Phylogenetic analysis based on the CP genes showed that the OrMV could be divided into two groups, in which 2677-NL was clustered together with five OrMV isolates from Australia (GenBank accession number: JQ807995, JQ807996, NC_019409, AF185964 and AF185965), suggesting these OrMV were highly homologous in the phylogenetic relationship. 【Conclusion】According to the species demarcation criteria of the family *Potyviridae* on the International Committee on Taxonomy (ICTV), the 2677-NL was an isolate of OrMV, and it showed that the saffron corms sample was infected by OrMV. This is the first report on OrMV infecting *C. sativus* in the world.

Key words: *Ornithogalum mosaic virus*; *Crocus sativus*; RT-PCR; new host

0 引言

【研究意义】番红花 (*Crocus sativus*) 又名藏红花、西红花, 为鸢尾科 (Iridaceae) 番红花属 (*Crocus*) 多年生球茎草本植物, 是一种名贵药材和香料^[1]。在番红花的种植过程中, 易受到各种病虫害的危害, 包括各种植物病毒^[2]。对于番红花这种以无性繁殖为主的植物来说, 一方面, 植物病毒可以通过繁殖体从上一生长季传播到下一生长季, 成为重要的初侵染源; 另一方面, 通过农事操作、介体传播等方式, 植物病毒可以从发病植株传播给健康植株。因此, 一旦用于繁殖的番红花携带植物病毒, 即使带毒率非常小, 经过多年的繁殖栽培, 也能够造成植物病毒在番红花植株中普遍存在, 且容易造成多种病毒种类复合侵染现象, 导致种球变小、品种退化, 严重影响番红花的产量和质量。近年来, 随着中国从国外引进优良的番红花品种越来越频繁, 各种有害生物传入境内的风险也越来越高。因此, 加强口岸检疫, 可以有效防止各种有害生物的入侵危害。【前人研究进展】目前, 已报道的侵染番红花的病毒至少有 10 种, 分属于 7 个病毒属, 包括马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的菜豆黄花叶病毒 (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)、鸢尾重型花叶病毒 (*Iris severe mosaic virus*, ISMV)、鸢尾轻型花叶病毒 (*Iris mild mosaic virus*, IMMV) 和芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV); 马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*) 的水仙花叶病毒 (*Narcissus mosaic virus*, NMV); 线虫传多面体病毒属 (*Nepovirus*) 的

南芥菜花叶病毒 (*Arabis mosaic virus*, ArMV); 烟草脆裂病毒属 (*Tobravirus*) 的烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV); 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV); 坏死病毒属 (*Necrovirus*) 的烟草坏死病毒 (*Tobacco necrosis virus*, TNV); 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 的番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)^[3-8]。其中, ArMV 和 TSWV 是中国严格禁止进境的检疫性有害生物。在中国番红花中已报道的病毒种类有 3 种, 即 BYMV^[9]、IMMV^[10]和 TuMV^[11], 均属 *Potyvirus* 属病毒。电子显微镜观察病毒粒体形态、细胞病理学观察、鉴别寄主鉴定、DAS-ELISA 检测、RT-PCR 检测及序列测定分析是检测鉴定番红花病毒的主要方法^[4-11]。虎眼万年青花叶病毒 (*Ornithogalum mosaic virus*, OrMV) 又称天鹅绒嵌纹病毒、翅柱兰 Y 病毒 (*Pterostylis virus Y*, PtVY), 属于马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)、*Potyvirus* 属的成员^[12-13]。病毒粒体线状, 长 720—760 nm, 宽 12 nm^[14]。可通过蚜虫非持久性传播^[14]、汁液传播^[15]。其基因组为一条正 ssRNA, 长 9 442、9 445 或 9 475 nts, 含有一个大的开放阅读框, 编码一个 341.5 kD 的聚合蛋白, 具有典型的 *Potyvirus* 属病毒的基因组结构特征^[16-17]。OrMV 最早在美国报道, 目前在荷兰^[18]、南非^[14]、法国的留尼汪岛^[19]、以色列^[20]、印度^[21-22]、韩国^[23]、日本^[15,24]、新西兰^[25]和澳大利亚^[16,26]等地均有报道发生。在中国台湾地区曾在进境的虎眼万年青中检出该病毒^[27], 而在中国大陆地区则在英国等地引进种植的围裙水仙和

喇叭水仙上发现该病毒^[28]。自然情况下, OrMV 可侵染鸢尾科 (Iridaceae) 的唐菖蒲属 (*Gladiolus*)^[22]、雄黄兰属 (*Crocasmia*) (KF493898)、鸢尾属 (*Iris*)^[14,21]; 百合科 (Lillaceae) 的虎眼万年青属 (*Ornithogalum*)^[14,24,29]; 兰科 (Orchidaceae) 的香荚兰属 (*Vanilla*)^[19]、双尾兰属 (*Diuris*)^[16]、绒唇兰属 (*Eriochilus*)^[26]、翅柱兰属 (*Pterostylis*)^[26]、铠兰属 (*Corybas*)^[26]、鸟兰属 (*Chlloglottis*)^[26]; 天门冬科 (Asparagaceae) 的非洲莲香属 (*Lachenalia*)^[14,29]、石蒜科 (Amaryllidaceae) 的水仙属 (*Narcissus*)^[28,30]、六出花科 (Alstroemeriaceae) 的六出花属 (*Alstroemeria*)^[18]等植物。【本研究切入点】基于 PCR 技术的分子检测方法, 已越来越多应用于口岸植物病毒的快速检测鉴定中。其中, 根据基因组序列的保守区域设计简并引物所建立的病毒属或病毒科的通用 PCR 或 RT-PCR 方法, 是快速筛查检测同一类病毒的一种高效、灵敏的检测方法, 结合序列分析可在短期内实现同一类病毒 (如某个病毒属) 种类的检测与鉴定^[31-33]。【拟解决的关键问题】利用 *Potyviridae* 科通用 RT-PCR 方法^[34]对一批旅客携带的番红花种球进行检测, 以证实该批番红花种球携带 OrMV, 防止该病毒入境危害。

1 材料与方法

试验于 2016 年在厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心植物检疫实验室完成。

1.1 番红花种球

一袋番红花种球, 共计 25 粒, 来自香港航班的旅客行李中截获, 包装袋上显示来自荷兰 (Aviflora Trading B.V.)。

1.2 样品制备及核酸提取

混合样品: 把种球分为两组 (12 粒、13 粒), 每粒球茎切取约 0.05 g 的薄片, 用植物汁液提取仪 (MEKU Erich Pollähne GmbH) 研磨, 然后用 3.0 mL 样品提取缓冲液冲洗收集。经 8 000 r/min 离心后, 取 250 μ L 的上清液, 根据操作说明用 TRIzol 方法 (Invitrogen 公司) 提取总 RNA。

单粒种球: 切取约 0.1 g 的球茎薄片, 用研钵研磨后用 TRIzol 方法提取总 RNA。

1.3 RT-PCR 检测

取 4 μ L 的总 RNA 和 2 μ L Oligo(dT)₁₈ 引物 (10 μ mol·L⁻¹), 于 65℃ 水浴中处理 10 min, 然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5×M-MLV buffer 4 μ L、dNTP Mixture (10 mmol·L⁻¹; 宝生物工程 (大连) 有限公司)

1 μ L、M-MLV 反转录酶 (200 U· μ L⁻¹; Promega 公司) 1 μ L、RNase inhibitor (40 U· μ L⁻¹; 宝生物工程 (大连) 有限公司) 1.0 μ L, 无菌水补足至 20 μ L。37℃ 水浴处理 1 h, 70℃ 水浴 10 min, 冰上冷却, 即得到作为 PCR 模板的 cDNA。

采用 *Potyviridae* 科通用引物 Sprimer: (5'-GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC-3', N=A, T, G, C; Y=T, C; R=A, G) 和 M4T (5'-GTTTTCAGTCACGAC(T)₁₅-3') 进行 PCR 扩增^[34]。PCR 反应体系 (50 μ L): 10×EasyTaq Buffer (plus Mg²⁺) 5 μ L, 引物 Sprimer 和 M4T 各 2 μ L (10 μ mol·L⁻¹), cDNA 模板 6 μ L, dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μ L, Easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L (5 U· μ L⁻¹; 北京全式金生物技术有限公司), 双蒸水补足至 50 μ L。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 47℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 结束后 4℃ 保存。取 5 μ L 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后在凝胶成像仪上观察、拍照。

1.4 序列分析

PCR 产物经回收后, 进行克隆测序, 由宝生物工程 (大连) 有限公司完成。序列拼接后, 用基本局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)、MEGA 等软件进行序列分析和系统发育分析。其中, 用 MEGA 6 中的最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树^[35], 自举检验 (bootstrap) 1 000 次, 并以石蒜花叶病毒 (*Vallota mosaic virus*, ValMV, EF114726) 为外群; 用 BLAST 和基于对数期望的多重序列比较 (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, MUSCLE) 进行序列比对分析。用于比较分析的虎眼万年青花叶病毒 (OrMV) 其他分离物序列下载自 GenBank, 其寄主、国家或地区等信息见表 1。

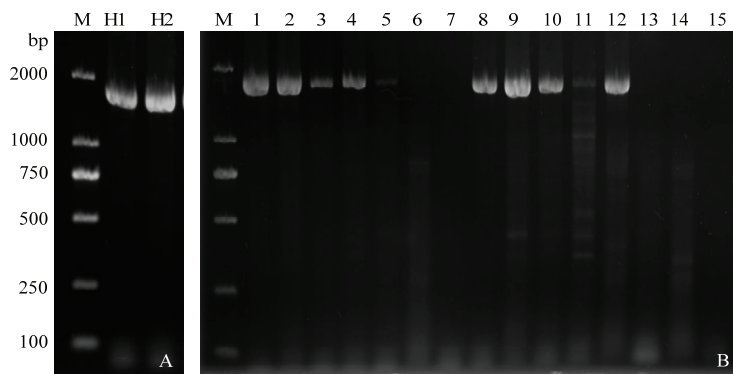
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

利用 *Potyviridae* 科的通用 RT-PCR 方法, 在两组混合样品中均扩增到约 1.7 kb 的条带, 且未见其他条带产生 (图 1-A)。对其中 14 粒种球进行单独检测, 结果显示 14 个种球样品中 8 个种球样品明显扩增到约 1.7 kb 的预期条带, 5 号、11 号样品也出现预期大小条带, 但条带比较弱 (图 1-B)。该结果初步表明, 该批番红花种球携带有 *Potyviridae* 科病毒, 且种球带毒率在 57% 以上。

表 1 2677-NL 分离物与其他虎眼万年青花叶病毒分离物的外壳蛋白基因核苷酸（nt）和氨基酸（aa）序列一致性
Table 1 Percentages of coat protein gene nucleotides (nt) and amino acid (aa) sequence identities between 2677-NL isolate and other OrMV isolates

登录号 GenBank number	分离物 Isolate	寄主 Host	国家 Country	一致性 Identity (%)	
				nt	aa
KF493898	Crocsmia	雄黄兰 <i>Crocsmia</i> sp.	荷兰 Netherlands	77.9	82.9
JQ686723	Glad-3	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	79.3	84.1
JQ686722	Glad-8	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	75.1	72.1
JQ686720	Glad-6	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	71.5	65.7
JN692498	Glad-7	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	71.8	66.9
JN692497	Glad-9	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	77.6	77.7
JN692496	Glad-4	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	75.6	73.7
JF682235	Lucknow	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	印度 India	77.3	79.7
FJ573184	Glad-11	唐菖蒲 <i>Gladiolus</i> sp.	荷兰 Netherlands	83.0	92.8
AY994106	/	鸢尾 <i>Iris</i> cv. Wedgewood	新西兰 New Zealand	81.1	88.8
AF080587	/	虎眼万年青 <i>Ornithogalum</i> spp.	以色列 Israel	82.8	90.0
AY845014	VM-33	香荚兰 <i>Vanilla fragrans</i>	印度 India	80.7	88.4
AY845013	VM-19	香荚兰 <i>V. fragrans</i>	印度 India	81.0	87.6
D00615	OMV-O	白云花 <i>Ornithogalum thyrsoides</i>	南非 South Africa	81.0	88.4
AY994107	/	丹吉尔鸢尾 <i>Iris tingitana</i>	新西兰 New Zealand	80.6	87.6
AY994102	/	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	新西兰 New Zealand	80.6	88.8
AJ510250	Kr	鸢尾 <i>Iris</i> sp.	韩国 South Korea	80.8	87.3
NC_019409	KP	双尾兰 <i>Diuris</i> sp.	澳大利亚 Australia	99.3	99.2
JQ807996	SW3.3	双尾兰 <i>Diuris</i> sp.	澳大利亚 Australia	99.5	99.2
JQ807995	SW3.1	双尾兰 <i>Diuris</i> sp.	澳大利亚 Australia	99.1	99.2
JN127345	Bate9	西班牙鸢尾 <i>I. xiphium</i>	澳大利亚 Australia	81.0	88.0
AF203528	/	鸢尾 <i>Iris</i> sp.	澳大利亚 Australia	80.7	87.3
FJ159375	OSS-5	虎眼万年青 <i>Ornithogalum</i> spp.	美国 USA: Maryland	86.3	92.8
FJ159374	OSS-1	虎眼万年青 <i>Ornithogalum</i> spp.	美国 USA: Maryland	86.4	92.8
FJ159373	LQD2	立金花 <i>Lachenalia aloides</i>	美国 USA: Maryland	91.1	96.4
FJ159372	LachX	非洲莲香 <i>Lachenalia</i>	美国 USA: Maryland	82.5	85.3
FJ159371	Lac33	非洲莲香 <i>Lachenalia</i>	南非 South Africa	91.4	96.8
FJ618533	/	鸢尾 <i>Iris</i> sp.	新西兰 New Zealand	80.9	87.6
AB091836	G	橙花虎眼万年青 <i>O. dubium</i>	日本 Japan: Akita	80.7	87.7
AB091835	7-3	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	日本 Japan: Akita	81.1	88.8
AB079650	C28	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	日本 Japan	81.5	87.6
AB079649	C23	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	日本 Japan	85.9	92.4
AB079648	C22	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	日本 Japan	85.9	92.8
AB079647	C7	白云花 <i>O. thyrsoides</i>	日本 Japan	91.8	96.8
AJ493580	Hangzhou	水仙 <i>Narcissus</i> sp.	中国 China	80.3	87.6
AF185965	Eriochilus	白兔兰 <i>Eriochilus dilatatus</i>	澳大利亚 Australia	98.9	99.2
AF185964	Pterostylis	翅柱兰 <i>Pterostylis coccinae</i>	澳大利亚 Australia	98.6	98.4



M: TaKaRa DL2000 DNA Marker; H1、H2: 混合种球样品 Mixed corm sample; 1—14: 单粒种球样品 Single corm sample; 15: 空白对照 Blank control

图 1 番红花种球中马铃薯 Y 病毒科病毒的 RT-PCR 扩增 (引物 Sprimer 和 M4T)

Fig. 1 RT-PCR amplification of saffron corms using the Sprimer and M4T primers of *Potyviridae*

2.2 序列测定与分析

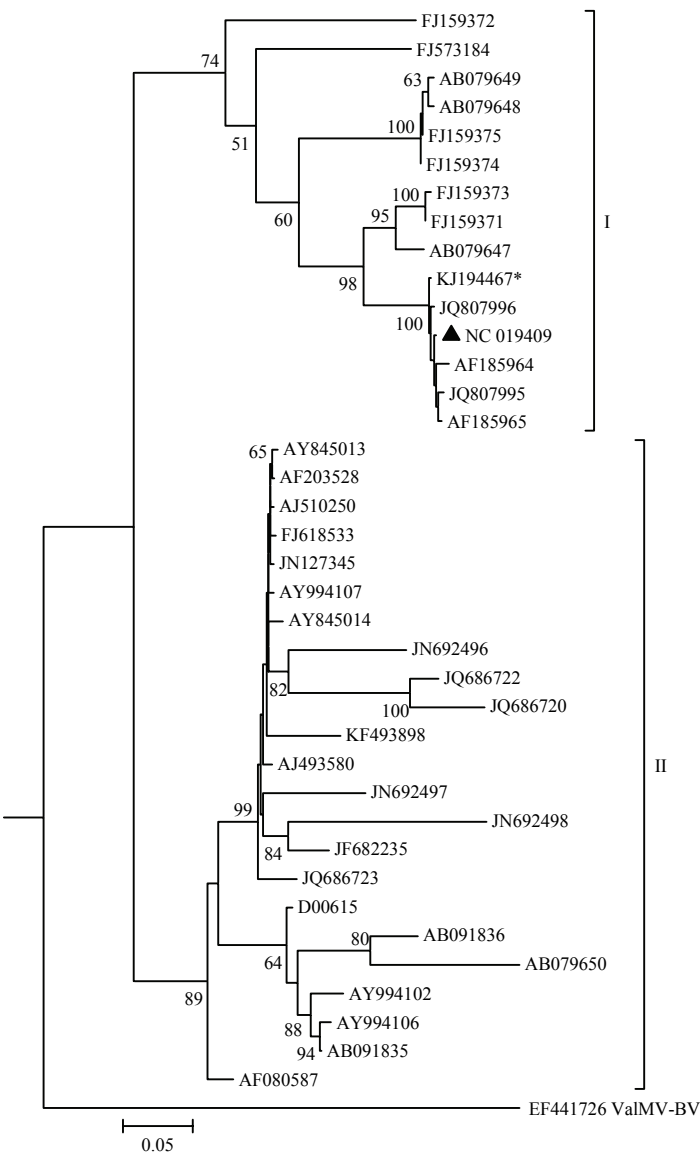
随机取其中一个混合样品的 RT-PCR 产物进行克隆测序, 共测定 1 666 nts 的序列 (不包括 22 nts 的 A 尾), GenBank 登录号为 KJ194467, 命名为 2677-NL。该分离物与 OrMV SW3.3 分离物 (JQ807996) 的序列一致性最高, 为 99.6%; 与 NCBI 中 OrMV 参考基因组序列 (Reference genomic sequences, RefSeq; NC_019409) 的序列一致性为 99.1%。序列分析显示, 该序列含有部分聚合蛋白 (polyprotein) 基因和 3'-端非编码区 (3'-UTR)。其中, 1—636 nts 为部分核内含体 b 基因 (nuclear inclusion b, *NIb*) 的 3'端序列, 637—1 395 nts 为完整的外壳蛋白基因 (coat protein, *CP*) 序列。

CP 基因序列分析显示, 2677-NL 与其他 OrMV 分离物的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 71.5%—99.5%和 65.7%—99.2% (表 1)。其中, 2677-NL 的核苷酸序列与 Glad-4 (JN692496)、Glad-6 (JQ686720)、Glad-8 (JQ686722) 和 Glad-7 (JN692498) 4 个分离物的序列一致性 <76%; 与 Glad-4 (JN692496)、Glad-6 (JQ686720)、Glad-7 (JN692498)、Glad-8 (JQ686722)、Glad-9 (JN692497) 和 Lucknow (JF682235) 6 个分离物的氨基酸序列一致性 <80%。2677-NL 与其他 32 个 OrMV 分离物的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 77.9%—99.5%和 82.9%—99.2%, 分别 >76%和 80%。国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 关于 *Potyviridae* 科病毒种类区分标准之一是: *CP* 的核苷酸和氨基酸序列一致性分别 <76%和 80%。因此, 根据 ICTV 分类标准,

2677-NL 属于 OrMV 的一个分离物。

2.3 系统发育分析

根据 *CP* 构建的系统发育分析表明, 来自不同地区、不同寄主的 OrMV 分离物主要分归为 2 个大类群 (I 和 II)。虽然这 2 个类群并没有完全根据寄主或地域进行分类群 (如澳大利亚分离物的其中 2 个分离物和另外 5 个分离物在分属于 2 个不同的大类群中), 但在小分支中, 还是具有一定的寄主和地域相关性。如来自澳大利亚的 5 个分离物 (JQ807995、JQ807996、NC_019409、AF185964、AF185965) 处于同一个小分支中, 与地域相关; 而来自日本的 2 个分离物 (AB079648、AB079649) 和来自美国的 2 个分离物 (FJ159374、FJ159375) 也处于同一小分支中, 寄主均为虎眼万年青属, 与寄主相关; 来自印度的 7 个分离物 (JQ686720、JQ686722、JQ686723、JF682235、JN692496、JN692497 和 JN692498) 也处于同一个小分支中, 与寄主和地域相关。本研究的 2677-NL 分离物属于 I 群中, 与来自荷兰的 *Crocsmia* 分离物 (KF493898) 处于不同类群中, 与其中 5 个澳大利亚分离物 (JQ807995、JQ807996、NC_019409、AF185964、AF185965) 处于同一分支, 显示出最近的亲缘关系 (图 2)。这 5 个澳大利亚分离物寄主并不相同, 有侵染双尾兰属的 SW3.1 (JQ807995)、SW3.3 (JQ807996)、KP (NC_019409) 分离物, 侵染白兔兰的 *Eriochilus* 分离物 (AF185965), 侵染翅柱兰的 *Pterostylis* 分离物 (AF185964), 但均属兰科。系统发育分析结果进一步证实 2677-NL 属于 OrMV 的一个分离物。



*为本研究的 2677-NL 分离物；▲NCBI 中 OrMV 的参考基因组序列。节点上的数值为 1 000 次检验后的自举检验值 (≥50) * was the 2677-NL isolate used in this study. ▲ was NCBI reference genomic sequence of OrMV. The numbers on nodes indicated bootstrap values (≥50) after 1 000 replicates

图 2 基于虎眼万年青花叶病毒外壳蛋白基因序列构建的系统发育树（最大似然法）
Fig. 2 Phylogenetic tree of OrMV based on the coat protein gene sequences using maximum likelihood method

3 讨论

ICTV 第 9 次分类报告关于 *Potyviriade* 科病毒种类区分标准之一为 CP 蛋白序列一致性约<80%；CP 或整个基因组的核苷酸序列一致性<76%^[12,36]。本研究测定的 2677-NL 部分 3'末端序列与 OrMV 分离物最高序列一致性达 99.6%，与 OrMV 的 RefSeq (NC_019409) 的序列一致性为 99.1%，其 CP 与其中 32 个分离物（包括 OrMV 的 RefSeq）的核苷酸和氨

基酸序列一致性分别>76%和 80%。因此，根据 ICTV 分类标准，2677-NL 分离物应属于 OrMV 的一个分离物。这是首次在番红花中发现 OrMV 的报道，是侵染番红花的又一种 *Potyvirus* 属病毒。

在已知的 OrMV 分离物中，2677-NL 与其中 4 个分离物的核苷酸序列一致性<77%，与 6 个分离物的氨基酸序列一致性<80%。其中，2677-NL 与 Lucknow 分离物 (JF682235)^[21]的核苷酸序列一致性>76% (77.3%)，但氨基酸序列一致性略<80% (79.7%)，

根据 ICTV 分类标准, 应为同一病毒的不同分离物。2677-NL 与 Glad-9 (JN692497) 分离物的核苷酸序列一致性 > 76% 但氨基酸序列明显 < 80% (77.7%), 与 Glad-4 (JN692496)、Glad-6 (JQ686720)、Glad-7 (JN692498)、Glad-8 (JQ686722) 分离物的核苷酸和氨基酸序列一致性分别 < 76% 和 80%, 无法通过 CP 基因序列确定为同一病毒种类。ICTV 第 10 次分类报告中, 除了明确 CP 作为 *Potyviriade* 科病毒种类区分标准外, 还确定了整个开放阅读框 (open reading frame, ORF) 以及各个编码区作为种类区分的标准^[37]。因此, 对于这些分离物, 应该进一步比较分析整个 ORF 或不同的编码区序列, 以确认这些分离物是否为同一病毒种类。

BYMV、ISMV、IMMV 和 TuMV 是番红花中比较常见的病毒种类, 均属于 *Potyvirus* 属, 中国的番红花已报道除 ISMV 外的其他 3 种病毒^[9-11]。在本研究中, 利用基于简并引物的通用检测方法并结合序列分析, 发现的病毒并不是在番红花中已报道的 4 种 *Potyvirus* 属病毒, 而是一种在番红花中还没有报道的 OrMV。因此, 利用通用 RT-PCR 检测方法不仅可以用来快速检测已报道的番红花病毒, 而且还可以用来快速检测未报道的同一病毒属的其他病毒。该类方法通常只要一对引物、一次 RT-PCR 就可以检测不同种类的病毒, 是特异性 RT-PCR 方法不能够实现的, 是该类检测方法的一大优势。该类方法不仅可以减轻实验操作强度、缩短检测周期, 而且可以快速检测鉴定寄主中未报道的病毒种类、甚至新的病毒种类。

另一方面, 基于简并引物的通用 RT-PCR 方法, 可以快速得知一个样品中是否受到多种病毒的复合侵染。在本试验中, 如果不仅有 OrMV, 而且还有 BYMV、IMMV、ISMV、TuMV 中的一种或多种病毒的复合侵染, 当 PCR 产物直接测序时, 就会出现叠峰、套峰现象。然后进一步把 PCR 产物进行克隆, 并挑取多个克隆子进行测序, 就可以得到不同种类的病毒序列。因此, 利用通用 RT-PCR 方法检测时, 可以利用 PCR 产物直接测序以快速辨别是否为单一侵染或多种病毒的复合侵染。因此, 进行 PCR 产物克隆测序时, 建议至少单独测 5 个或以上的克隆子, 以辨别是否有多种病毒的复合侵染。

本研究所使用的 *Potyviridae* 科病毒通用 RT-PCR 检测方法, 已经广泛应用于该科病毒的检测。在文献中, 先使用 M4T 引物作为反转录合成 cDNA 的起始引物, 而后用 Sprimer 和 M4 引物作为 PCR 扩增引

物^[34]。在本研究中, 反转录时使用 Oligo(dT)₁₈ 引物代替 M4T 引物, 而 PCR 时用 M4T 引物代替 M4 引物。Oligo(dT)₁₈ 引物是反转录时常用的起始引物, 在各实验室或反转录试剂盒中基本都有配置。因此, 在 *Potyviridae* 科病毒通用 RT-PCR 检测中, 省去 M4 引物, 操作更为便捷。

本研究测定了 2677-NL 分离物的基因组 3'端部分序列, 含有部分 *NIb*、完整的 CP 和 3'-UTR 序列, 与 OrMV 的 SW3.3 分离物具有最高的序列一致性 (99.6%)。根据 CP 进行的系统发育关系分析表明, 在 2 个大类群中, 没有明显的地域、寄主相关性, 但在各小分支中, 具有一定的寄主、地域相关性。从包装信息来看, 本次截获的番红花种球来自荷兰。2677-NL 分离物与来自荷兰的 *Crocoshia* 分离物 (KF493898) 分属于 2 个类群中, 显示出比较远的亲缘关系。这可能是由于当前的种子苗木贸易非常频繁, OrMV 随着种子苗木的贸易在世界范围内快速扩散传播。

侵染番红花的病毒, 不仅有常见的 BYMV、CMV、NMV 等病毒, 而且还有中国严格禁止进境的检疫性病毒 ArMV 和 TSWV^[3-8]。在此之前中国口岸部门在进境的番红花种球中还未发现植物病毒, 该批番红花种球中发现 OrMV, 是口岸部门首次在进境番红花种球中发现植物病毒。因此, 口岸检验检疫部门不仅应该加强邮寄的包裹、旅客随身携带的行李检疫, 而且应该加强对大规模引进种植的番红花种球的病毒检疫, 以防止各种检疫性病毒的传入危害。此外, OrMV 不仅寄主范围比较广泛, 而且地理分布也越来越广^[18-30]。应该进一步对 OrMV 进行风险分析、危害等方面的研究, 并采取相应检疫措施, 以避免该病毒对中国的农业生产和环境生态产生新的威胁。

4 结论

根据 ICTV 分类标准, 2677-NL 属于 OrMV 的一个分离物。该批来自荷兰的番红花种球携带有 OrMV, 这是 OrMV 首次侵染番红花的报道, 是番红花上发现的又一种 *Potyvirus* 属病毒。

References

- [1] 兰卫, 朱金芳, 耿直. 新疆西红花的种植技术. 新疆医科大学学报, 2010, 33(8): 874-875.
- LAN W, ZHU J F, GENG Z. Planting techniques of Xinjiang saffron. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2010, 33(8): 874-875. (in Chinese)

- [2] AHRAZEM O, RUBIO-MORAGA A, CASTILLO-LÓPEZ R, MOZOS A T, GÓMEZ-GÓMEZ L. *Crocus sativus* pathogens and defence responses//HUSAINI A M. *Saffron. Functional Plant Science and Biotechnology*, 2010, 4(Special Issue 2): 81-90.
- [3] CAIOLA M G, FAORO F. Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 2011, 50(2): 175-182.
- [4] MIGLINO R, JODLOWSKA A, VAN SCHADEWIJK A R. First report of *Narcissus mosaic virus* infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease*, 2005, 89(3): 342.
- [5] CORONA F M O, LEBAS B S M, ELLIOTT D R, TANG J Z, ALEXANDER B J R. New host records and new host family range for *Turnip mosaic virus* in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 2007, 2(1): 127-130.
- [6] EHRIG F, KEGLER H, FUCHS E. Detection of a virus hitherto unknown in *Crocus vernus* hybrids. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 1997, 30(5): 453-455.
- [7] SAMUITIENĖ M, NAVALINSKIENĖ M, JACKEVIČIENĖ E. *Arabis mosaic virus* on ornamental plants. *Biologija*, 2008, 54(4): 264-268.
- [8] SAMUITIENĖ M, NAVALINSKIENĖ M. Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2008, 95(3): 135-143.
- [9] 谢礼, 吕明芳, 董峰丽, 饶君凤, 毛碧增, 洪健. 藏红花病毒病原的分子鉴定. 中草药, 2013, 44(8): 1033-1036.
XIE L, LÜ M F, DONG F L, RAO J F, MAO B Z, HONG J. Molecular identification of viral pathogens in *Crocus sativus*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(8): 1033-1036. (in Chinese)
- [10] 赵培洁, 许彩霞, 徐正, 高其昌. 由栽培番红花中检出鸢尾轻花叶病毒. 中药材, 1990, 13(5): 4-6.
ZHAO P J, XU C X, XU Z, GAO Q C. Identification of *Iris mild mosaic virus* in the cultivated *Crocus sativus*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1990, 13(5): 4-6. (in Chinese)
- [11] 陈集双, 李德葆. 侵染番红花的芜菁花叶病毒. 植物病理学报, 1995, 25(4): 361-365.
CHEN J S, LI D B. A *Turnip mosaic virus* infecting *Crocus sativus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1995, 25(4): 361-365. (in Chinese)
- [12] BURGER J T, BRAND R J, RYBICKI E P. The molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal region of *Ornithogalum mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 1990, 71(11): 2527-2534.
- [13] ADAMS M J, ANTONIW J F, FAUQUET C M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 2005, 150: 459-479.
- [14] BURGER J T, VON WECHMAR M B. Purification and some properties of South African isolates of *Ornithogalum mosaic virus*. *Phytopathology*, 1989, 79(4): 385-391.
- [15] 松本勤, 山本英樹, 高橋春實, 神田啓臣, 勝田茂満, 相馬玲子, 藤晋一, 井上正保. オーニソガラムモザイクウイルスによるオーニソガラムモザイク病の発生と宿主範囲を異にする分離株の存在. 日本植物病理学会報, 2007, 73(2): 102-105.
MATSUMOTO T, YAMAMOTO H, TAKAHASHI H, KANDA H, KATSUTA S, SOMA R, FUJI S, INOUE M. The first report on the occurrence of *Ornithogalum mosaic virus* in Japan and the presence of isolates differing in pathogenicity to dicot plants. *Japanese Journal of Phytopathology*, 2007, 73(2): 102-105. (in Japanese)
- [16] WYLIE S J, LI H, DIXON K W, RICHARDS H, JONES M G K. Exotic and indigenous viruses infect wild populations and captive collections of temperate terrestrial orchids (*Diuris* species) in Australia. *Virus Research*, 2013, 171: 22-32.
- [17] CHO S Y, LIM S, KIM H, YI S I, MOON J S. Complete genome sequence of *Ornithogalum* mosaic virus infecting *Gladiolus* spp. in South Korea. *Genome Announcements*, 2016, 4(4): e00816-16.
- [18] BOUWEN I, VAN DER VLUGT R A A. Natural infection of *Alstroemeria caryophyllaea* with *Ornithogalum mosaic virus*. *Plant Disease*, 2000, 84(2): 202.
- [19] GRISONI M, MOLES M, FARREYROL K, RASSABY L, DAVIS R, PEARSON M. Identification of potyviruses infecting vanilla by direct sequencing of a short RT-PCR amplicon. *Plant Pathology*, 2006, 55(4): 523-529.
- [20] ZEIDAN M, COHEN J, WATAD A, GERA A. Improved purification and molecular properties of *Ornithogalum mosaic virus* in Israel. *Annals of Applied Biology*, 1998, 133(2): 167-176.
- [21] CHANDEL V, KULSHRESTHA S, HALLAN V, ZAIDI A A. Natural infection of *Ornithogalum mosaic virus* on *Iris* from India. *Plant Pathology*, 2006, 55: 284.
- [22] KAUR C, RAJ S K, SNEHI S K, GOEL A K, ROY R K. Natural occurrence of *Ornithogalum mosaic virus* newly reported on gladiolus in India. *New Disease Reports*, 2011, 24: 2.
- [23] YOON H I, RYU K H. Molecular identification and sequence analysis of coat protein gene of *Ornithogalum mosaic virus* isolated from *Iris* plant. *The Plant Pathology Journal*, 2002, 18(5): 251-258.
- [24] FUJI S, INOUE M, YAMAMOTO H, FURUYA H, NAITO H, MATSUMOTO T. Nucleotide sequences of the coat protein gene of potyviruses infecting *Ornithogalum thyrsoides*. *Archives of Virology*, 2003, 148: 613-621.
- [25] WEI T, PEARSON M N, COHEN D. First report of *Ornithogalum*

- mosaic virus* and *Ornithogalum virus 2* in New Zealand. *Plant Pathology*, 2006, 55(6): 820.
- [26] GIBBS A, MACKENZIE A, BLANCHFIELD A, CROSS P, WILSON C R, KITAJIMA E, NIGHTINGALE M, CLEMENTS M. Viruses of orchids in Australia: their identification, biology and control. *Australian Orchid Review*, 2000, 65(3): 10-21.
- [27] 陈金枝, 张幼莉, 张清安, 蔡惠婷. 于进口之天鹅绒发生严重嵌纹之病株中发现由天鹅绒嵌纹病毒及 *Pterostylis virus Y* 复合感染之分子生物学证据. 植物病理学会刊, 2000, 9(4): 184-185.
- CHEN J Z, ZHANG Y L, ZHANG Q A, CAI H T. Molecular evidences for the dual infection of *Ornithogalum mosaic virus* and *Pterostylis virus Y* in an imported *Ornithogalum thyrsoides* plant with severe mosaic symptom. *Plant Pathology Bulletin*, 2009, 9(4): 184-185. (in Chinese)
- [28] 郑红英, 鲁宇文, 沈嘉乐, 林林, 陈炯, 陈剑平. 侵染水仙的虎眼万年青花叶病毒外壳蛋白的原核表达、抗血清制备及应用. 浙江农业学报, 2009, 21(3): 198-201.
- ZHENG H Y, LU Y W, SHEN J L, LIN L, CHEN J, CHEN J P. Prokaryotic expression of coat protein gene of *Ornithogalum mosaic virus* and its use in the antiserum preparation. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2009, 21(3): 198-201. (in Chinese)
- [29] BURGER J T, VON WECHMAR M B. Rapid diagnosis of *Ornithogalum* and *Lachenalia* viruses in propagation stock. *Acta Horticulturae*, 1988, 234: 31-38.
- [30] CHEN J, CHEN J P, LANGEVELD S A, DERKS A F L M, ADAMS M J. Molecular characterization of carla- and potyviruses from *Narcissus* in China. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(1): 26-29.
- [31] JAMES D, VARGA A, PALLAS V, CANDRESSE T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(1): 16-29.
- [32] 李鑫, 陈雅诗, 朱连, 张寅寅, 黑多尔, 廖富荣. 进境荷兰百合中车前草花叶病毒的分子鉴定及序列分析. 植物病理学报, 2017, 47(2): 197-202.
- LI X, CHEN Y S, ZHU L, ZHANG Y Y, HEI D E, LIAO F R. Molecular identification and sequence analysis of *Plantago asiatica mosaic virus* in *Lily* from Netherlands. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(2): 197-202. (in Chinese)
- [33] 叶志红, 廖富荣, 郭木金, 方志鹏, 陈青, 陈红运, 林石明, 林毅. 同时检测豇豆花叶病毒属与蚕豆病毒属病毒的通用 RT-PCR 检测方法. 中国农业科学, 2015, 48(8): 1527-1537.
- YE Z H, LIAO F R, GUO M J, FANG Z P, CHEN Q, CHEN H Y, LIN S M, LIN Y. A universal RT-PCR method for the simultaneous detection of the viruses in genera *Comovirus* and *Fabavirus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(8): 1527-1537. (in Chinese)
- [34] CHEN J, CHEN J, ADAMS M J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 2001, 146(4): 757-766.
- [35] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [36] ADAMS M J, ZERBINI F M, FRENCH R, RABENSTEIN F, STENGER D C, VALKONEN J P T. Family *Potyviridae*/KING A M, ADAMS M J, CARSTENS E B, LEFKOWITZ E J. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012: 1069-1089.
- [37] WYLIE S J, ADAMS M, CHALAM C, KREUZE J, LÓPEZ-MOYA J J, OHSHIMA K, PRAVEEN S, RABENSTEIN F, STENGER D, WANG A, ZERBINI F M, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, 2017, 98(3): 352-354.

(责任编辑 岳梅)