

藏红花病毒病原的分子鉴定

谢礼^{1,2}, 吕明芳², 董峰丽¹, 饶君凤³, 毛碧增^{1*}, 洪健^{1*}

1. 浙江大学生物技术研究所, 浙江 杭州 310058

2. 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021

3. 杭州职业技术学院, 浙江 杭州 310018

摘要: 目的 研究栽培藏红花的病毒病原。方法 综合运用病毒粒子形态和细胞病理学电镜观察、DAS-ELISA 检测、RT-PCR 检测及序列测定等技术进行病原鉴定。结果 透射电镜负染色观察到病株汁液含有 600~900 nm 的线状病毒粒子; 超薄切片观察到病株细胞质内有大量线状病毒粒子、II 型风轮状内含体和电子致密无定型体, 符合菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 的病理学特征。应用 BYMV 抗体进行病株 DAS-ELISA 检测结果为阳性, 应用马铃薯 Y 病毒属特异性引物 Sprimer 和 M4 对病株进行 RT-PCR 检测结果为阳性, 对阳性结果进行分子克隆及序列测定发现目标序列与 BYMV 有 99% 的同源性。结论 综合检测结果表明侵染浙江藏红花的病毒病原为 BYMV。

关键词: 藏红花; 病原鉴定; 菜豆黄花叶病毒; 分子鉴定; 分子克隆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1033-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.022

Molecular identification of viral pathogens in *Crocus sativus*

XIE Li^{1,2}, LV Ming-fang², DONG Feng-li¹, RAO Jun-feng³, MAO Bi-zeng¹, HONG Jian¹

1. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

3. Hangzhou Vocational and Technical College, Hangzhou 310018, China

Abstract: Objective To investigate the viral pathogens in cultivated *Crocus sativus*. **Methods** Viral pathogen identification was carried out by the observation of virus particle morphology and cytopathology as well as the detection of DAS-ELISA, RT-PCR, and sequencing. **Results** Linear virus particles of 600—900 nm in length were observed in *C. sativus* by negative staining under transmission electron microscope (TEM). Bundles of linear virus particles, cylindrical inclusion bodies of subdivision II, and amorphous inclusion bodies were observed in the cells of *C. sativus* under TEM after ultrathin-section. These observations resembled the cytopathology of infectious *Bean yellow mosaic virus* (BYMV). Positive result of DAS-ELISA was obtained from the leaves of *C. sativus* by using monoclonal antiserum against BYMV capsid protein. Positive result of RT-PCR induced by the *Potyvirus* specific primers (Sprimer and M4) was also obtained. Sequencing after RT-PCR revealed that the viral sequence in this diseased *C. sativus* had a homology of 99% with the BYMV sequence. **Conclusion** The pathogenic virus of this *C. sativus* disease is identified as BYMV.

Key words: *Crocus sativus* L.; pathogen identification; *Bean yellow mosaic virus*; molecular identification; molecular cloning

藏红花 *Crocus sativus* L. 又称番红花、西红花, 为鸢尾科番红花属的多年生植物, 是一种传统的妇科中药材和观赏花卉, 具有重要的药用价值和经济价值。其柱头入药, 味甘性平, 具有疏经活络、通经化瘀、散瘀开结、消肿止痛、凉血解毒等功效, 能全面提高人体免疫力, 用于预防和治疗脑血管、脉管炎、血亏体虚、产后瘀血、神经衰弱、惊悸癫

狂等疾病。近年来还发现藏红花柱头中的藏红花素具有抗癌效果, 更加大其药用价值^[1-4]。藏红花仅以柱头入药, 其野生资源有限, 需要人工栽培扩大产量才能满足广泛的药用需求, 我国在浙江、上海、江苏、山东、河南、北京、四川、福建等省均有大规模人工栽培, 其中浙江建德为主要产地之一。

栽培藏红花在田间种植两三年后会出现叶片黄

收稿日期: 2012-07-21

基金项目: 浙江省杭州市农业科研攻关项目 (20110232B16); 浙江省中药材农业新品种选育重大科技专项 (2012C12912-7)

作者简介: 谢礼 (1982—), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事分子植物病毒学研究。Tel: (0571)86419210 E-mail: hyena.xieli@yahoo.com.cn

*通信作者 毛碧增 Tel: (0571)88982678 E-mail: maobz@zju.edu.cn

洪健 Tel: (0571)86971179 E-mail: jhong@zju.edu.cn

色条纹、植株矮化黄化、顶端枯死、球茎畸形而导致品质退化,产量下降。研究表明藏红花此病症是由病毒感染引起的^[5],目前国内外报道侵染藏红花的主要病毒有鸢尾花叶病毒^[5] (*Iris mosaic virus*, IMV)、鸢尾轻型花叶病毒^[6-7] (*Iris mild mosaic virus*, IMMV)、菜豆黄花叶病毒^[8-9] (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)、芜菁花叶病毒^[10-12] (*Turnip mosaic virus*, TMV)等,大部分为马铃薯 Y 病毒属成员。在藏红花的脱毒繁育工作中,对病毒病原的诊断鉴定是一关键环节^[13]。由于国内对藏红花病毒病的研究不够系统,早期的报道大多基于传统指示植物症状测定方法,而缺乏分子生物学的鉴定依据,所得到的结论并不十分可靠。为了明确我国栽培藏红花病毒病的病原,本实验综合运用了病毒粒子和细胞病理电镜观察、双抗体夹心酶联免疫吸附(DAS-ELISA)、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及序列测定等手段,对浙江地区的栽培藏红花病株进行病原鉴定,结果证实为 BYMV,是国内该病原侵染藏红花的首次报道。

1 材料

藏红花病株采自浙江建德,症状为黄化花叶、植株明显矮缩。实验使用的引物 Sprimer、M4 和 M4T 由浙江省农业科学院郑红英副研究员提供;RNA 提取用 Trizol 试剂和 SuperScript III Reverse Transcriptase 逆转录酶购自 Invitrogen 公司;Ex Taq DNA 聚合酶购自 Takara 公司;凝胶回收 QIAquick Gel Extraction 试剂盒购自 Qiagen 公司;T4 DNA 连接酶和 pGEM T-载体购自 Promega 公司;BYMV 多抗血清由深圳出入境检验检疫局技术中心郑耘博士惠赠;其余试剂均为进口分析纯。

2 方法

2.1 病毒粒子形态观察

藏红花病叶经研磨后,铜载网蘸取组织汁液,用 2% 磷钨酸(pH 6.7)负染色,滤纸吸干。在 Hitachi H-7650 型透射电镜下观察,加速电压 80 kV, Gatan 830 型 CCD 记录图像。

2.2 细胞病理学观察

细胞病理学电镜观察的样品制备参照谢礼等^[14]方法,采用戊二醛-四氧化钨双固定,乙醇梯度脱水,丙酮取代,Spurr 树脂包埋,超薄切片经柠檬酸铅和醋酸铀双染色,Hitachi H-7650 型透射电镜下观察,加速电压 80 kV, Gatan 830 型 CCD 记录图像。

2.3 DAS-ELISA 检测

采用针对 BYMV 外壳蛋白的多抗血清,对病叶汁液进行 DAS-ELISA 检测,以健康的藏红花叶片为对照,以封闭液取代一抗的反应为阴性对照。每个样品做 3 个点样孔的重复,ELISA 结果使用 Bio-Rad Model 680 型酶标仪测定吸光度,以目标吸光度值的读板数据比阴性结果大于 2 判定结果为阳性。

2.4 RT-PCR 检测和测序分析

选取新鲜的藏红花病叶,按照 Invitrogen Trizol 试剂盒的操作说明提取总 RNA,保存于 -70 °C 备用。以总 RNA 为模板使用针对马铃薯 Y 病毒属的特异引物 M4 加 polyT 序列设计的引物 M4T (特异性结合基因组 3' 末端 polyA 结构,5'-GTTTTCCCA-GTCACGAC(T)₁₅-3') 进行 RT 反应合成第一链 cDNA^[15-16]。以 cDNA 为模板,使用特异针对马铃薯 Y 病毒属基因组序列设计共 1 600~1 700 bp (包含保守性较高的 NIb、CP 基因片段及 3'-UTR 区,具体长度视不同病毒而定)的一对上下游引物 Sprimer (5'-GGXAAYAAYAGYGGXCAZCC-3', X=A、G、C 或 T; Y=T 或 C; Z=A 或 G) 和 M4 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'),用 Ex TaqDNA 聚合酶进行 PCR 反应扩增获得病毒基因组的部分片段。扩增产物经凝胶回收试剂盒回收纯化后用 T4 DNA 连接酶与 pGEM-T 载体进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,经蓝白斑反应筛选重组子重组质粒,再经 PCR 验证是否成功连接(使用 T 载体特异性引物 T7 5'-TAATACGACTCACTATAGG-GAGA-3', SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')。将阳性重组质粒送测序公司进行测序,测序结果递交 NCBI/DDBJ/GenBank 数据库,与数据库存储数据经 BLAST 比对分析确定同源性。

3 结果与分析

3.1 病毒粒子形态观察和细胞病理学观察

病叶汁液经负染色后在透射电镜下观察到柔软弯曲的线状病毒粒子,无包膜,长度为 600~900 nm 不等,直径为 12 nm (图 1-A)。超薄切片透射电镜观察感病藏红花的细胞病理学变化,在叶肉细胞中存在着大量线状病毒粒子(图 1-B)和风轮状内含体(图 1-C)。风轮状内含体的臂为长片层状聚集体,围绕一个中心呈伸展的旋转辐射状排列,或脱落于风轮主体散布在细胞质中。在细胞质中没有观察到卷筒体、短片层聚集体。依据上述风轮状内含体的形态结构可判定其为 II 型风

轮状内含体^[17-18]。另外，细胞质中还存在着大量电子致密的无定形体（图 1-D），是 BYMV 的典型细胞病理学特征^[14,18]。

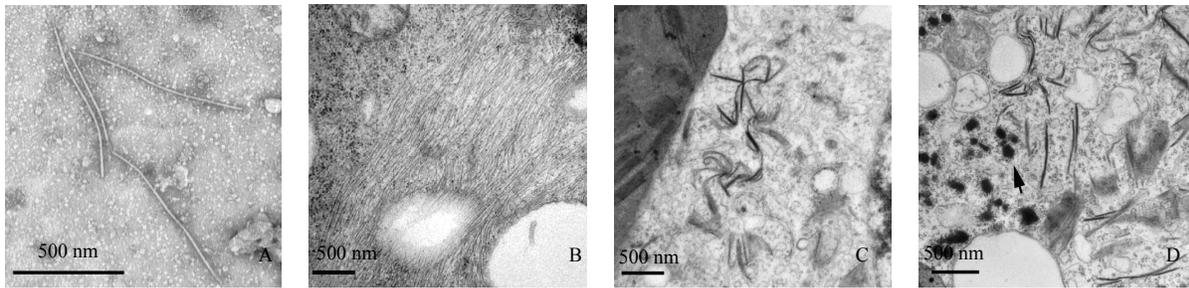
3.2 DAS-ELISA 检测

用 BYMV 抗体对染病和健康藏红花进行 DAS-ELISA 检测，染病、健康藏红花和阴性对照平均吸光度值分别为 0.794、0.141、0.155。健康藏红花为阴性（吸光度值与阴性对照的比值为 0.91），病

株为阳性（吸光度值与阴性对照的比值为 5.12），表明藏红花病株中含有高浓度的 BYMV。

3.3 RT-PCR 检测与序列测定

以 *Potyvirus* 属病毒通用引物 Sprimer 和 M4 进行 RT-PCR 扩增出的条带经电泳检测长度约 1.7 kb（图 2），与预期长度为 1.6~1.7 kb 包含 NIB、CP 基因和 3'-UTR 区的片段大小相符。说明感病藏红花病原是马铃薯 Y 病毒属成员。为了确认具体是哪种

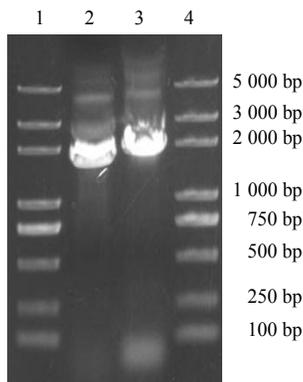


A-病汁液中长度为 600~900 nm 的线状病毒粒子 B-细胞质中观察到的大量线状病毒粒子 C-细胞质中分布有风轮状内含体和长片层聚集体 D-细胞质中的长片层聚集体和电子致密无定型体（箭头）

A-linear virus particles in crude sap of 600—900 nm in length B-linear virus particles in cytoplasm C-pinwheel-like inclusion bodies and long lamella aggregation in cytoplasm D-long lamella aggregation and electron-dense amorphous inclusion bodies (arrow) in cytoplasm

图 1 藏红花病毒粒子形态和细胞病理学观察结果

Fig. 1 Observation of virus particle morphology and cytopathology in *C. sativus*



1、4-Marker 2-*Potyvirus* 属特异引物 Sprimer/M4 RT-PCR 扩增感病藏红花 3-T 载体引物 T7/SP6 PCR 扩增重组子
1 and 4-Marker 2-RT-PCR amplification of infected *C. sativus* by Sprimer/M4 of *Potyvirus* 3-PCR amplification of recombinant by Primers T7/SP6

图 2 RT-PCR 结果

Fig. 2 RT-PCR results

病毒，本课题组对 RT-PCR 条带进行序列测定。阳性条带凝胶回收后重组至载体上并转化感受态细胞，用特异引物 T7 和 SP6 进行 PCR 验证重组子得到片段长度为 1.9 kb（与上述 1.7 kb 相比增加了部分载体序列），表明重组子片段连接成功（图 2）。重组

子测序结果片段长度为 1 751 bp，经 BLAST 比对序列分析表明，该病毒序列与 NCBI/DDBJ/GenBank 数据库收录的 BYMV 各个株系的 CP 基因片段核苷酸序列同源性为 96%~99%。分析认为本序列为 BYMV 浙江藏红花分离物，暂命名为 BYMV-saf-ZJ。

4 讨论

藏红花由于其特殊的药用价值，20 世纪 80 年代开始作为重要经济作物在国内得到大规模引种，由病毒病引起的种质衰退随之成为影响藏红花生产的主要因素，为此综合利用各项技术对我国栽培藏红花的病毒病原进行科学鉴定以明确病毒种类，为组培脱毒及病毒防控提供理论依据。

本研究应用电镜负染色观察到组织汁液中有大量 600~900 nm 的弯曲线状病毒粒子，同时在超薄切片中观察到细胞质内存在着大量风轮状内含体，这是马铃薯 Y 病毒科成员所特有的一种细胞病理学特征。该内含体是由病毒编码的 7×10^4 蛋白聚集形成的圆柱状结构，其横切面呈风轮状、卷筒状、片层状等，纵切面呈束状或管状。根据横切面的形状，Edwardson 将其分为 4 个类型^[17]，本实验观察到的主要为伸展的风轮体和片层聚集体，属于 II 型。另

外, 细胞质中还分布着大量电子致密无定型体, 这是病毒编码的 5.2×10^4 蛋白聚集体 (HC-Pro) 成分, 这两种内含体均符合 BYMV 的细胞病理特征。而 TuMV 的风轮状体比较卷曲, 并有卷筒体和片层聚集体, 属于 III 型, 而且不形成电子致密无定型体^[15]。通过电镜观察基本可以判断浙江建德的藏红花病株中含有类似于 BYMV 的 *Potyvirus* 病毒。在电镜形态鉴定的基础上, 本课题组进一步通过 DAS-ELISA 和 RT-PCR 方法进行血清学测定和分子鉴定, 用 BYMV 抗体进行 DAS-ELISA 检测结果为强阳性, 以 *Potyvirus* 特异引物 Sprimer 和 M4 进行 RT-PCR 检测结果为阳性, 分子克隆测序后经 BLAST 比对发现与 BYMV 有 96%~99% 的同源性, 最终确定侵染浙江建德藏红花的病原为 BYMV, 与前面的判断完全一致。

目前国内藏红花的栽培规模较大, 各栽培地区的地理情况存在差异, 引种的来源也不同, 造成病毒病日趋严重, 病原较为复杂。从本研究结果来看, 侵染浙江建德藏红花的病毒病原为 BYMV, 这是国内 BYMV 侵染藏红花的首次报道。至于我国各地栽培藏红花的病毒病以哪种病原为主, 或者是多种病毒病原均存在, 还需要进行广泛的调查研究才能明确。

参考文献

- [1] Escribano J, Alonso G L. Crocin and crocetin picrocrocin from saffron inhibit the growth of human cancer cell *in vivo* [J]. *J Cancer Lett*, 1996, 100: 1913-1918.
- [2] 萨如拉, 张玲, 吴岩. 藏红花抗肿瘤的研究进展 [J]. 内蒙古医学院学报, 2006, 28: 548-552.
- [3] Abdullaev F I. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227: 20-25.
- [4] Wang C J, Cheng T C. Inhibition of protein kinase C and protonocogene expression of crocetin in NIH/3T3 cell [J]. *Mol Carcinog*, 1996, 17: 235-240.
- [5] Klinkowski M, Flanzliche P. *Virology Band 4, Die Virose an Zierpflanzen, Geholzen und wildpflanzen in EUropa* [M]. Berlin: Akademic Verlag Press, 1977.
- [6] Navalinskijene M, Samuitiene M. Viruses affecting some bulb and corm flower crops [J]. *Biologija*, 2001, 4: 40-42.
- [7] 赵培洁, 许彩霞. 由栽培番红花中检测出鸢尾轻花叶病毒 [J]. 中药材, 1990, 13(5): 4-6.
- [8] Caiola M G. Virus-like particles in cells of Saffionflowers [J]. *Phytopathol Z*, 1982, 10: 92-95.
- [9] Derks A F, Hollinger T C, Vink-van den Abeele J L. Identification and symptom expression of four elongated viruses infecting bulbous irises [J]. *Acta Horticult*, 1985, 164: 309-317.
- [10] 陈集双, 李德葆. 侵染番红花的芜菁花叶病毒研究 [J]. 植物病理学报, 1995, 25(4): 361-365.
- [11] 陈集双. 番红花花叶病的发生于防治 [J]. 浙江农业科学, 2000(3): 132-134.
- [12] Ochoa C F M, Lebas B, Elliott D R, *et al.* New host records and new host family range for *Turnip mosaic virus* in New Zealand [J]. *Aust Plant Dis Notes*, 2007, 2: 127-130.
- [13] 陈书安, 陈文浩, 王晓东, 等. 无毒藏红花组培芽的获取及其病毒检测 [J]. 高技术通讯, 2006, 16: 1170-1175.
- [14] 谢礼, 刘文洪, 洪健, 等. 复合侵染的蚕豆黄花叶病毒病原诊断 [J]. 电子显微学报, 2006, 25: 167-171.
- [15] 郑滔, 陈炯, 陈剑平. 杭州郊区菜豆花叶病原的分子鉴定 [J]. 浙江农业学报, 2002(14): 178-181.
- [16] Chen J, Chen J P, Adams M. A universal PCR primer to detect members of the potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family [J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 757-766.
- [17] Roberts I M, Wang D, Findlay K, *et al.* Ultrastructural and temporal observations of the Potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. [J]. *Virology*, 1998, 245: 173-181.
- [18] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.