

# 侵染安康魔芋的芋花叶病毒外壳蛋白基因克隆及分析

刘欢, 吴薇 (安康学院现代农业与生物科技学院, 陕西安康 725000)

**摘要** 采用 RT-PCR 方法克隆了侵染安康魔芋的芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus, DsMV) *cp* 完整基因序列, 结果表明: DsMV 魔芋分离物 *cp* 基因大小为 903 bp, 推导编码的外壳蛋白由 301 个氨基酸组成。Blast 比对结果显示, 覆盖度仅有 72%~80%, 一致性为 80.30%~87.98%; 系统发育分析显示 DsMV 安康魔芋分离物独立于组 III 中, 具有较大的分子变异, 且不同寄主分离物和不同地理位置来源的 DsMV 在进化树中没有明显相关性。

**关键词** 魔芋; 芋花叶病毒; 外壳蛋白; 序列分析

中图分类号 S435.39 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)18-0090-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.18.022



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Cloning and Sequence Analysis of Coat Protein Genes of Dasheen Mosaic Virus Infecting *Amorphophallus rivieri* from Ankang

LIU Huan, WU Wei (College of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000)

**Abstract** The complete coat protein (*cp*) gene of Dasheen mosaic virus (DsMV) infecting *Amorphophallus rivieri* from Ankang was cloned by RT-PCR. The results showed that *cp* gene of DsMV infecting *Amorphophallus rivieri* from Ankang is 903 bp in length, encoding a predicated protein of 301 amino acids. Blast sequence alignment showed that the query cover was only 72%–80% and the consistency was 80.30%–87.98%. Phylogenetic analysis indicated that DsMV isolate *Amorphophallus rivieri* from Ankang was independent in group III and had much molecular variability. There was no significant correlation between DsMV isolates from different hosts and different geographical sources in the evolutionary tree.

**Key words** *Amorphophallus rivieri* Durieu; Dasheen mosaic virus; Coat protein; Sequence analysis

魔芋(*Amorphophallus rivieri* Durieu)属于天南星科魔芋属多年生草本植物, 含有多种人体必需的微量元素, 广泛应用于食品、药品、农业化工等领域, 具有很好的保健功效<sup>[1]</sup>。陕西是全国四大魔芋主产省份之一, 安康魔芋已经被评为中国国家地理标志产品<sup>[2]</sup>。近年来, 随着魔芋种植面积不断扩大, 品种逐渐增多, 被称为“植物癌症”的各种病毒病逐渐成为制约魔芋产业发展的关键因素<sup>[3]</sup>。

国内魔芋产区真菌、细菌和病毒病害发生较为普遍<sup>[4-5]</sup>, 相对于真菌、细菌病害, 病毒病害的研究薄弱。由于魔芋以无性繁殖为主, 病毒易通过种芋远距离传播, 制约魔芋产业持续健康发展。芋花叶病毒(Dasheen mosaic virus, DsMV)是天南星科植物最重要的病毒病原之一<sup>[6]</sup>。DsMV 主要在天南星科的大田作物、药用植物以及花卉上侵染为害<sup>[7]</sup>。其侵染作物后可引起系统症状或隐症现象<sup>[8]</sup>。据不完全统计, 被 DsMV 侵染的天南星科作物, 产量损失能达到 60%左右<sup>[9-10]</sup>。

DsMV 是马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员, 基因组为正义单链 RNA(+ssRNA), 全长约 10 kb, 仅编码一个大的多聚蛋白, 通过自身编码的蛋白酶将多聚蛋白加工成多个具有功能的蛋白, CP 蛋白位于多聚蛋白的末端<sup>[11]</sup>。目前已公布的 DsMV 基因组信息多来自芋头和马蹄莲, 而 DsMV 魔芋分离物基因组信息却鲜见报道, 或者仅有部分 *cp* 基因序列信息。笔者克隆了 DsMV 安康魔芋分离物完整的 *cp* 基因, 并对其进行了分子特性分析, 旨在为建立可靠的病毒分子检测方法提供重要信息, 并为后续研究其分子致病机制打下基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 感染 DsMV 的魔芋叶片采集于安康市农业科学研究院, 其叶片症状表现为严重的黄化、畸形和卷叶。取其新鲜叶片保存于安康学院现代农业与生物科技学院分子遗传实验室-80℃超低温冰箱备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 魔芋叶片基因组 RNA 提取与反转录。**取 0.1 g 叶片, 加入液氮进行研磨, 迅速转入 1.5 mL 无酶离心管中, 按照北京康为世纪的 Omni Plant RNA Kit 试剂盒提取说明书操作提取 RNA。以 RNA 为模板, 合成 cDNA, 反应总体积为 25 μL, 包含 RNA 模板 3.0 μL, Oligo D(18)T(TaKaRa, 10 μmol/L) 1.0 μL, 5×Reaction Buffer 5.0 μL, dNTPs(100 mmol/L each) 2.0 μL, M-MLV(Promega) 1.0 μL, Ribo-Lock RNase Inhibitor 0.5 μL, RNA-Free Water 12.5 μL。

**1.2.2 *cp* 基因扩增与检测。**根据 GenBank 中登录的 DsMV 基因组序列, 使用 mega 6.0 进行多重比对, 在基因保守区域应用 Primer Premier 5.0 软件设计用于扩增完整 *cp* 的引物 CP-F(5′-GCACCATATATTGCTGAAAC-3′), CP-R(5′-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3′), 引物由西安擎科公司合成。RT-PCR 反应体系: cDNA 模板 2 μL, CP-F 引物 2 μL, CP-R 引物 2 μL, PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(TaKaRa) 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL。PCR 反应程序: 98℃变性 10 s, 52℃退火 15 s, 72℃延伸 15 s, 进行 35 个循环。PCR 结束后, 取 5 μL PCR 产物进行电泳检测。

**1.2.3 PCR 产物测序与分析。**利用 DNA 回收纯化试剂盒对 RT-PCR 产物进行回收纯化, 将回收产物与 pGEM-T Easy Vector 进行连接, 转入大肠杆菌 DH5α, 提取质粒送至西安擎科生物公司测序。使用 Vector NTI Advance V11.5.2 软件中的 ContigExpress 程序, 将测序得到的 ABI 文件导入, 去除 NIB

**基金项目** 陕西省教育厅一般项目(21JK0467); 陕西省科协高校青年人才托举计划(20210212); 安康市科技计划(AK2020-NY-02); 安康学院高层次人才引进专项(2020AYQDZR07)。

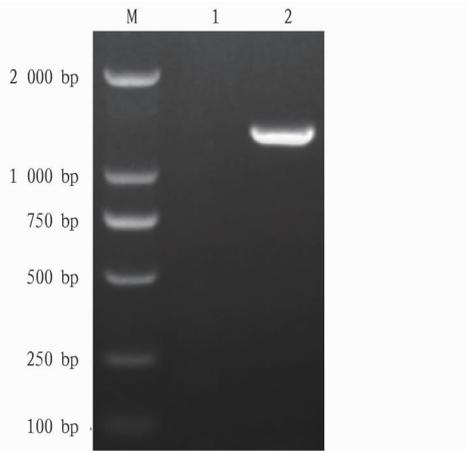
**作者简介** 刘欢(1990—), 男, 陕西周至人, 讲师, 博士, 从事植物病毒学相关研究。

**收稿日期** 2022-04-15

和 3'-UTR 基因序列,获得完整的 *cp* 序列。从 GenBank 获得 DsMV 不同分离物 *cp* 基因序列,使用 MEGA 6.0 中的 ClustalW 算法进行多重比对,采用 Neighbor-Joining (NJ) 法,将 Bootstrap Replications 设置为 1 000,构建系统发育树。

## 2 结果与分析

**2.1 DsMV *cp* 基因扩增与测序** 使用 CP-F 和 CP-R 引物,以 cDNA 为模板,PCR 扩增得到约 1.3 kb 的单一一条带(图 1),与预期扩增到的基因片段大小吻合。



注:M.DS 2000 DNA Marker;1.使用 CP-F/R 扩增健康魔芋叶片样品;2.使用 CP-F/R 扩增受 DsMV 侵染的魔芋叶片样品

Note:M.DS 2000 DNA Marker;1.Amplify healthy *Amorphophallus rivieri* leaf samples with CP-F/R;2.Use CP-F/R to amplify *Amorphophallus rivieri* leaf samples infected with DsMV

图 1 DsMV *cp* 基因 RT-PCR 扩增

Fig.1 RT-PCR amplification of DsMV *cp* gene

序列经过测序后拼接,使用 ContigExpress 程序去除 NIB 和 3'-UTR 基因序列,最终得到的 DsMV 魔芋分离物 *cp* 基因全长为 903 bp,将完整的 DsMV *cp* 序列上传至 GenBank 并获得 ID 号(Access number:ON003977)。

**2.2 DsMV 安康魔芋分离物 *cp* 基因系统发育分析** 该研究测定了侵染安康魔芋 DsMV 的 *cp* 核苷酸序列,序列比对结果表明,DsMV 安康魔芋分离物变异较大,GenBank 中所有参与比对的序列与该研究获得的 DsMV 安康魔芋分离物序列的覆盖度仅 72%~80%,一致性为 80.30%~87.98%(图 2)。

在 GenBank 上获得的 DsMV 分离物信息见表 1,与该研究得到的序列联合分析。系统发育分析表明,DsMV *cp* 基因可分为 3 个组(组 I、组 II 和组 III)(图 3)。已公布的 DsMV *cp* 基因多聚集在组 I 中,这些分离物寄主均是天南星科植物,且分布范围广,从进化树来看,它们并没有寄主特异性,且与寄主地理位置没有明显联系;组 II 中仅有来自中国芋头的一个分离物;该研究获得的 DsMV 安康魔芋分离物单独归于组 III。

## 3 小结与讨论

DsMV 自然状态下主要侵染天南星科植物,20 世纪 60 年代美国学者在芋头中发现该病毒<sup>[12]</sup>,之后日本、越南、新西兰等国家相继发现 DsMV 侵染不同寄主植物<sup>[13-14]</sup>。我国学者在 20 世纪 90 年代在马蹄莲中通过血清学和电子显

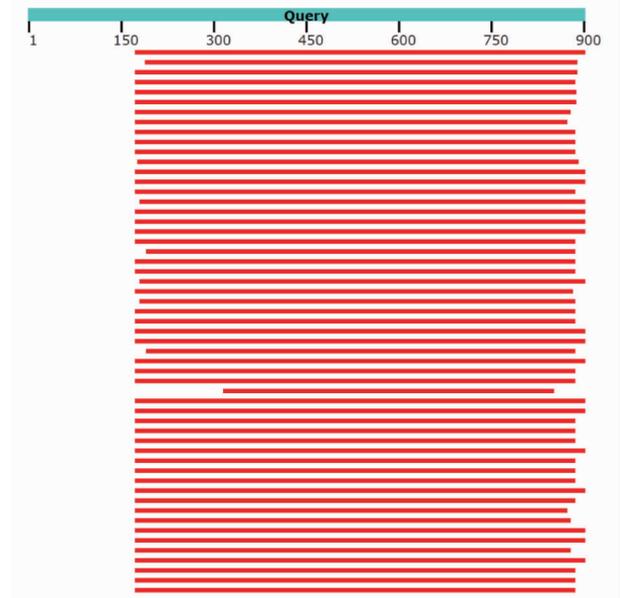


图 2 比对序列与目标序列的覆盖度

Fig.2 Coverage of the compared sequence and the target sequence

表 1 从 NCBI 中获得的 DsMV *cp* 序列信息

Table 1 DsMV *cp* sequence information obtained from NCBI

登录号 GenBank ID	样品地点 Sample location	寄主 Host	序列长度 Sequence length//bp
LC114504	日本	魔芋	1 150
AM910401	尼加拉瓜	芋头	975
MG602227	埃塞俄比亚	芋头	10 073
AJ298036	日本	芋头	1 241
MW701396	中国	独角莲	9 737
AJ298034	中国	马蹄莲	1 842
AY994104	新西兰	芋头	1 941
AF511485	未知	马蹄莲	1 314
KT372699	中国	马蹄莲	1 826
DQ925465	越南	芋头	1 789
JN692172	中国	芋头	951
MZ043618	中国	独角莲	9 737
AF169832	中国	天南星科	1 868
EF199550	中国	魔芋	1 890
KY242359	美国	芋头	10 019

显微镜检测到 DsMV<sup>[15]</sup>。随后国内学者在芋头、半夏和白附子中相继发现 DsMV<sup>[16]</sup>。由于天南星科植物多数依靠无性繁殖,病毒主要通过种苗传播,亦可通过蚜虫或机械摩擦传播。而我国是天南星科植物种植大国,陕西安康岚皋县魔芋已经被评为中国国家地理标志产品。随着魔芋种植面积增加,加之魔芋常年进行无性繁殖,易导致病毒积累、种性退化,丰产性和品质均难以保证。而目前魔芋病毒病的研究仅仅停留在病原鉴定、田间调查、组织病变和 RT-PCR 检测层面,魔芋中 DsMV 发生情况和分子特征却鲜见报道。

该研究克隆了侵染安康魔芋的 DsMV *cp* 基因,并对其进行分子特征分析,表明其为完整的 DsMV 魔芋分离物 *cp* 基因序列,全长为 903 bp,推导编码的外壳蛋白由 301 个氨基酸

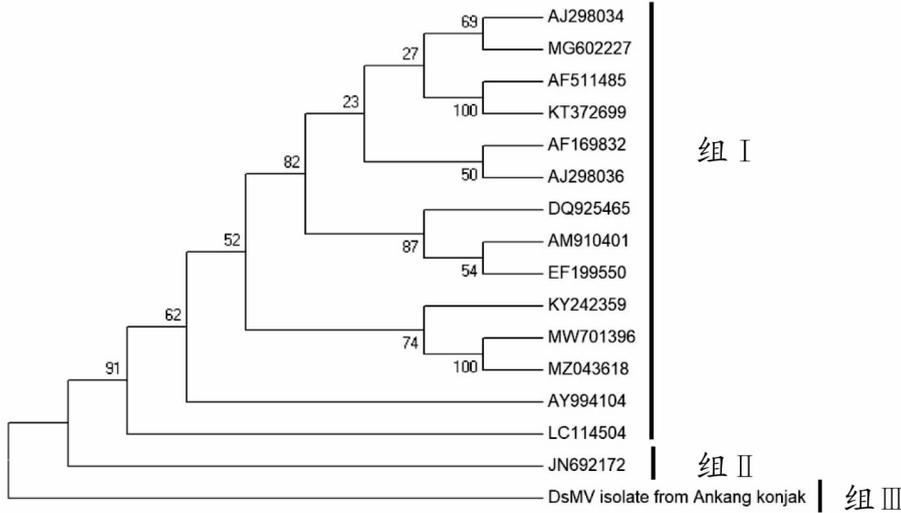


图3 DsMV cp 基因核苷酸序列构建系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of DsMV cp gene nucleotide sequence construction

组成。从结果看来,前 150 bp 序列未参与比对,可见其碱基序列差异较大,DsMV 魔芋分离物与其他寄主分离物之间存在很大的分子变异。由于 GenBank 中 DsMV 魔芋分离物序列极少,通过其他寄主分离物联合分析,初步判断 DsMV 没有明显的寄主专化性和地理位置相关性。

该研究结果为后续 DsMV 魔芋分离物的分子特征和病害流行病学综合研究奠定了基础,同时为魔芋抗病毒育种、建立更可靠的 DsMV 分子检测技术、全基因组测定和致病机制的研究提供参考。

#### 参考文献

- [1] 刘佩瑛.魔芋学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 崔鸣,王显安,赵兴喜,等.秦巴山区魔芋健身高产栽培技术研究[J].陕西农业科学,2010,56(6):92-94.
- [3] 费甫华,杨廷芳,张明海,等.我国魔芋病害防治研究新进展[C]//第三届湖北湖南植保农药学术研讨会论文集.北京:中国农业出版社,2004:202-206.
- [4] 何斐,崔鸣.魔芋软腐病生物防治研究进展[J].陕西农业科学,2017,63(1):64-67.
- [5] 崔鸣,李川.秦巴山区两种魔芋病害的综合治理[J].湖北农业科学,2011,50(5):952-954.
- [6] CHEN J, CHEN J P, CHEN J S, et al. Molecular characterisation of an isolate of *Dasheen mosaic virus* from *Zantedeschia aethiopica* in China and comparisons in the genus *Potyvirus*[J]. Archives of virology, 2001, 146(9):

- 1821-1829.
- [7] NELSON S C. Dasheen mosaic of edible and ornamental aroids[D]. Hawaii: University of Hawaii, 2008.
- [8] REYES CASTRO G, NYMAN M, RÖNNBERG-WÄSTLJUNG A C. Agronomic performance of three cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) genotypes grown in Nicaragua[J]. Euphytica, 2005, 142(3): 265-272.
- [9] ZETTLER F W. *Dasheen mosaic virus* as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture[J]. Plant disease, 1987, 71: 958-964.
- [10] 李永伟. 天南星科植物病毒研究——I: 天南星科植物病毒的分子检测 II: 2 种天南星科作物的脱毒培养[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [11] REYES G, RAMSELL J N E, NYMAN M, et al. Sequence characterization of *Dasheen mosaic virus* isolates from cocoyam in Nicaragua[J]. Archives of virology, 2009, 154(1): 159-162.
- [12] ZETTLER F W, FOXE M J, HARTMAN R D, et al. Filamentous viruses infecting Dasheen and other Araceae plants[J]. Phytopathology, 1970, 60(6): 983-987.
- [13] HA C, REVILL P, HARDING R M, et al. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam[J]. Archives of virology, 2008, 153(1): 45-60.
- [14] FARREYROL K, PEARSON M N, GRISONI M, et al. Vanilla mosaic virus isolates from French Polynesia and the Cook Islands are *Dasheen mosaic virus* strains that exclusively infect vanilla[J]. Archives of virology, 2006, 151(5): 905-919.
- [15] 陈集双, 高其康, 李德葆. 引起马蹄莲花叶病的芋花叶病毒[J]. 中国病毒学, 1993, 8(3): 271-276.
- [16] 施世明, 王国平, 徐文兴, 等. 芋花叶病毒的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因序列分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(3): 509-515.