

赵娜, 苗艳梅, 赵敏. 未知植物病毒分子生物学检测方法的研究现状[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 224-228.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.032

未知植物病毒分子生物学检测方法的研究现状

赵娜^{1,2}, 苗艳梅¹, 赵敏¹

(1. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 白城师范学院, 吉林 白城 137000)

摘要: 植物的真菌病原菌可以通过核糖体 RNA 或者其他通用引物进行鉴定, 植物病毒缺乏通用引物, 这给植物未知病毒病的鉴定带来较大挑战。随着分子生物学及测序技术的发展, 出现了很多直接从植物病料中检测未知病毒的方法, 这些方法推进了植物病毒的发掘和病原鉴定, 取得了非常好的效果。本文主要阐述近年来应用于检测未知植物病毒的分子生物学方法。

关键词: 未知植物病毒; 分子生物学; 检测方法

中图分类号: S432.4⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)01-0224-05

Research status of molecular biological detection methods for unknown plant viruses

ZHAO Na^{1,2}, MIAO Yan-mei¹, ZHAO Min¹

(1. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Baicheng Normal University, Baicheng 137000, China)

Abstract: The fungal pathogen in plants can be identified by ribosomal RNA or other universal primers. Due to the lack of universal primers for plant viruses, the diagnosis of unknown viral diseases in plants encountered a great challenge. With the development of molecular biology and sequencing technology, there were many methods for detecting unknown viruses directly from plant diseases. The discovery and identification of plant viruses were promoted by using these methods, and good results were achieved. This paper reviews the application of molecular biological detection methods for unknown plant viruses in recent years.

Key words: unknown plant virus; molecular biology; detection methods

对植物而言, 植物病毒是仅次于真菌的第二大病原, 由于其流行和爆发对粮食危害极大, 且防治困难, 故有植物癌症之称。据不完全统计, 受植物病毒影响, 全世界每年粮食总产量损失约 10%^[1]。有关植物病毒的研究已有 100 多年历史, 但大多数研究仅限于农作物中的疾病, 有很多植物病毒未被发现。植物病毒结构特殊, 而且没有通用的编码序列^[2-3], 这增加了植物病毒研究的难度, 植物病毒的多样性仍是未知的, 有待新的研究方法去揭秘。

植物病毒的传统检测方法主要包括指示植物鉴别法、血清学试验法[如酶联免疫吸附试验(ELISA)]、分子杂交技术法、电镜技术法。最近, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 聚合酶链式反应(PCR)技术、基因芯片^[4-6]等已广泛应用于植物病原的鉴定中。但是, 利用这些常用试验方法进行鉴定的前提是必须了解病原物的生物学特性和基因组特征。譬如, 基因芯片技术可以一次性检测 10 种病毒, 但只能检测未知病害植物中的已知病毒^[7]。这些方法对于植物未知病毒的挖掘以及植物新病害的诊断研究有很强的限制性, 在实际工作中不易推广。由此可见, 未知植物病毒的检测方法在新病毒发现方面发挥着十分重要的作用。本文重点阐述利用分子生物学技术检测未知植物病毒的研究现状。

收稿日期: 2018-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(51678120)

作者简介: 赵娜(1985-), 女, 河南新乡人, 博士, 讲师, 研究方向为微生物学。(E-mail) Bszhaona2013@163.com

通讯作者: 赵敏, (E-mail) 82191513@163.com

1 基于传统分子生物学技术的未知病毒检测方法

随着分子生物学技术的发展,出现了很多针对未知植物病毒的检测技术。由于植物病毒基因组结构较为简单,多为1个或者2个开放阅读框,且核酸会残存在发病植物病料中,故可以通过追踪、放大基因组本身的方法鉴定核酸序列^[8-9],再与NCBI数据库中已知病毒序列进行比对,利用生物软件分析病毒生物学特征,确诊病原。现阶段,基于传统分子生物学的未知植物病毒检测方法主要有双链RNA(dsRNA)技术、cDNA代表性差异分析(RDA)技术、核酸序列非依赖性引物扩增技术等。

1.1 dsRNA 技术

植物病毒基因组以RNA为主,占90%以上。双链RNA是RNA病毒、类病毒等在寄主体内形成单链核糖核酸(ssRNA)的特异复制中间型产物,具有病毒特异性,且性质稳定,不随寄主改变而改变。因此,提取植物组织或者病毒粒子中的dsRNA,可用于病毒种类鉴别,病毒侵染诊断^[10]。1986年Dale等^[11]首次从表现出典型症状的香蕉病株中分离得到dsRNA,并在以后的研究中确定存在于寄主植物韧皮部组织的病毒粒体为香蕉束顶病毒(BBTV)。现阶段,越来越多的研究者通过提纯dsRNA^[12],提高样品中核酸的有效率,结合二代测序方法来检测未知病毒。同时,dsRNA的提取方法^[13]也在不断更新、完善,为植物病毒各个领域的研究提供技术保障。

1.2 cDNA 代表性差异分析技术

cDNA代表性差异分析技术建立在cDNA文库的基础上,通过提取患病和健康植物的总RNA,逆转录形成cDNA,对比患病植物与健康植物cDNA的差异,进行消减,减小文库规模,进而得到差异的cDNA序列,进行多次杂交,去除相同核酸,降低二次扩增背景的影响^[14]。战晴晴^[15]在构建柴胡全长cDNA文库时,虽然首次发现蚕豆萎蔫病毒2(BB-WV-2)可以侵染柴胡,但没有发现新病毒。总之,cDNA代表性差异分析方法较为繁琐、费时,且发现新病毒的几率较小。

此外,Cooper等^[16]利用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法,通过分析差异表达蛋白质来鉴定植物感染的未知病原体。这种利用质谱法分析差异蛋白质的方法类似于cDNA代表性差异分析

技术,但由于其数据的缺失值较多,获得结果的质量好坏以及可靠性高低参差不齐,给差异蛋白质的筛选造成了很大阻力。

1.3 核酸序列非依赖性单引物扩增技术

核酸序列非依赖性单引物扩增技术(SISPA)是一种平末端连接扩增技术^[17],原理如图1显示,起初仅用于检测DNA病毒,后来有学者采用改良的DNase-SISPA技术测定未知DNA和RNA病毒的序列,证实了该扩增方法对RNA病毒检测的有效性^[18-20]。由于该方法不需要提纯病毒,可以直接从病样中提取核酸,所以近年来越来越多的实验室通过此方法检测未知植物病毒。赵西梅^[21]通过提取dsRNA病毒,并以其为模板进行非序列依赖性PCR扩增,成功从有病症的地黄中分离到油菜花叶病毒(ORMV)和地黄花叶病毒(ReMV),从有病症的白术中分离出香豆萎蔫病毒2号(BBWV2)。

1.4 简并核苷酸引物扩增技术

简并核苷酸引物扩增技术(DOP)是通过巧妙设计引物来进行序列非依赖性扩增的,原理如图2显示,以3'端和5'端的特异性核苷酸序列以及中间6个核苷酸构成的随机引物为引物群,起初的引物是很随机的,但随着3'端引物上特异性核苷酸的结合,在随后的反应过程中,扩增产物的核酸匹配度越来越高,产物通过测序比对,即可找到未知的植物病毒序列。Badillo等^[22]对叶脉有条纹状坏死而且顶梢和叶侧脉部变黄的番茄植株进行检测时,利用等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)简并引物的方法进行扩增,最终获得番茄坏死条纹病毒(TomNSV)全基因组,基因组分析结果表明,该病毒是亚组2的新成员。Ciuffo等^[23]在调查叶片具有病毒样症状(花叶、畸形和坏死)的莴苣时,利用马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)外壳蛋白(CP)所设计的简并引物成功扩增出1种新病毒,暂命名为意大利莴苣坏死病毒(LINV),该病毒可以通过桃蚜非持久性方式进行传播。

Shahid等^[24]在鉴定黑莓黄脉病病原时,利用简并引物检测到一种新的双链DNA病毒,暂时称为黑莓病毒F(BVF),该病毒为杆状DNA病毒属(*Badnavirus*)新成员。一种暂命名为金盏花花叶病(Ad-MV)的香石竹斑驳病毒属(*Carmovirus*)新成员是科研人员通过简并引物方法发现的^[25]。由于简并引物技术可操作性较强,耗时短、费用低,近年来在很多植物的未知病原鉴定中发挥重要作用。

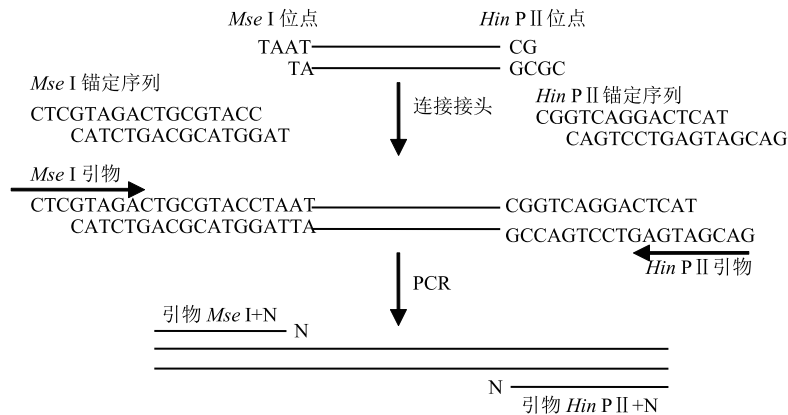


图 1 核酸序列非依赖性单引物扩增技术原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of nucleic acid sequence independent single primer amplification technology

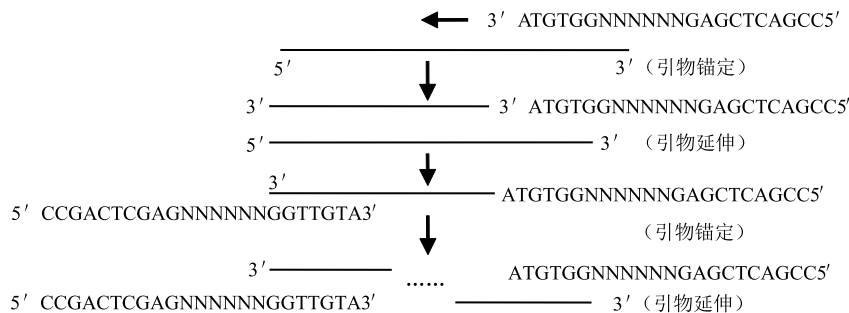


图 2 简并核苷酸引物扩增技术原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of degenerate oligonucleotide primer amplification technology

2 基于新型测序技术的未知病毒检测方法

上述几种未知病毒检测的最终结果都必须依靠核酸的 Sanger 测序技术,通过 NCBI 网站 Blast 比对最终确定病毒种类。第二代测序技术(NGS)的推出,打破了 Sanger 测序技术的瓶颈,进入高通量测序技术时代,为挖掘新的未知病毒提供了新思路^[26]。

NGS 从 2009 年开始应用于植物病毒领域,该领域包括植物病毒的发现,基因组序列测定以及生态学和流行病学研究^[27]。这种新检测技术的流程主要包括样品核酸的准备,核酸文库的构建,上机测序,生物信息学数据分析等基本过程。根据核酸样品的不同来源,可以将 NGS 技术分为 2 大类,其中一类以宏基因组为研究对象,另一类以 siRNA (Small interfering RNA)为研究对象。

2.1 基于宏基因组学的 NGS

宏基因组学以特定生态环境中全部微生物的遗

传信息为研究对象,来研究部分微生物的功能基因筛选以及微生物与环境或者个体之间的关系^[28],样品中病毒核酸如何富集,即核酸的有效性是保证测序质量的关键。利用 NGS 的宏基因组学对植物病毒的最早研究来自于英国学者 Adams 等^[29],为了保证 NGS 测序质量,提高样品核酸的有效性,先将从蛇鞭菊中获得的病原分离物摩擦接种到千日红,再通过对宿主核酸消减杂交,构建 cDNA,进行 NGS,最终获得一个名为蛇鞭菊轻斑驳病毒(GMMV)的黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)新成员。同样,Green 等^[30]将病样分离物摩擦接种于本氏烟,从而提取有症状的本氏烟总 RNA,构建 cDNA 文库,利用 Illumina 公司的 NextSeq 500 平台进行 NGS,最终获得芜菁黄花叶病毒属(*Tymovirus*)的新成员,暂时命名为奎东茄褪绿花叶病毒(NarCMV)。

Tang 等^[31]为了提高 NGS 病毒序列的检出率,先将病原分离物摩擦接种于本氏烟,提取本氏烟总核酸,利用脱氧核糖核酸酶 I 消除 DNA,同时消减宿主

的 rRNA,利用消减后的 RNA 构建 cDNA 文库,基于 454 平台进行 NGS,最终获得一个暂时命名为罂粟花叶病毒(OPMV)的全基因组序列。值得关注的是,根据 RNA 病毒中间体 dsRNA 的特征,Petrzik 等^[32]通过直接提取样品中的 dsRNA,大大减少宿主核酸的影响,构建文库,进行 NGS,最终获得醋栗病毒 A(CuVA)。此外,为了进一步减少宿主核酸的影响,Pardina 等^[33]直接从提纯的病毒颗粒中提取核酸,进行 NGS,最终获得甘薯 G 病毒(SPVG)的全基因组序列。

2.2 基于 siRNA 深度测序的 NGS

siRNA 是在 RNA 沉默机制中产生的一种具有序列特异性调控功能的分子^[34-35]。植物 RNA 沉默机制的主要功能之一是抗病毒。植物对病毒产生适应性免疫应答反应,会在被病毒侵染的植物细胞中产生与病毒相关的 siRNA,这些 siRNA 可用于检测植物中的 RNA 和 DNA 病毒,甚至可用于检测一些结构新颖的类病毒。siRNA 与已知病毒没有明显的序列相似性,因此,siRNA 高通量测序技术不依赖于已知病毒信息,可以检测样品群体中的全部病毒信息,适用于新病毒的发现,为植物未知病毒研究开拓新的思路^[36-37]。

迄今为止,通过对 siRNA 进行 NGS,检测植物未知病原分离物较成功的案例来自于 Li 等^[38]的报道。他们提取有症状番茄样品中的 siRNA,并进行深度测序,生物信息学分析结果表明,样品中含有马铃薯纺锤块茎病类病毒(PSTVd)、凤果花叶病毒(PepMV)和 1 种新的病毒[暂时命名为番茄坏死矮化病毒(ToNSV)]。有学者采用 siRNA 深度测序技术,发现了 2 种蔷薇科植物内侵染的新病毒,即来自野蔷薇样品的玫瑰叶丛簇伴随相关病毒(RLRaV)和来自有果实开裂症状桃植株样品的桃裂果伴随相关病毒(PCFaV)^[39-40]。此外,陈莎^[41]利用小 RNA 深度测序技术对云南省和贵州省玉米病毒病进行检测,获得 3 种未知的 RNA 病毒[玉米黄化花叶病毒(MYMV)、玉米相关的形影病毒(MAUV)、玉米相关的整体病毒(MATV1)]和 1 种国内首次报道的 DNA 病毒[留尼旺玉米线条病毒云南分离物(MSRV-YN)]。

3 展望

植物病毒多样性的研究尚处于起步阶段,作物中新病毒的发现,野生植物中新病毒的潜在生态影响以及病毒在感染植物中的潜在作用,这些问题的

解决都依赖于未知病毒检测技术的发展。综上所述,利用已有的基因组序列,设计各个病毒属所特有的简并引物进行扩增,这种方法操作简单、费用低,是研究人员发现新病毒的首选方法。由于病毒种类繁多,所以研究人员需要克服简并引物设计的困难。

NGS 技术具有高效、快速、非序列依赖性的优势,革新了发现和鉴定病毒的方法,在短短 5 年时间内发现多种新病毒种类,但是 NGS 也有一定缺陷^[42]。首先,对于病毒滴度较小的病毒,二代测序技术往往会忽略该类病毒的存在;其次,NGS 虽然可以发现传统方法难以发现的新病毒,但是它往往会忽略科赫法则,不能证明新病毒是导致病害的病原体;再次,对于较大规模的植物病毒种类普查项目,二代测序技术的成本昂贵。总之,单一的未知植物病毒分子生物学检测技术,难免存在局限性,所以在实际应用中,应根据样品和调查项目状况,有针对性地选择 1 种或者几种检测技术,才能有效挖掘更多未知的植物病毒。

参考文献:

- [1] STRANGE R N, SCOTT P R. Plant disease: a threat to global food security[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 83-116.
- [2] SEIFERT K A. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9: 83-89.
- [3] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(4): 846-849.
- [4] GOLDSMITH C S, MILLER S E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4): 552-563.
- [5] BYSTRICKA D, LENZ O, MRAZ I, et al. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 128(1/2): 176-182.
- [6] 王莉爽,陈小均,何海永,等. 贵州辣椒脉斑驳病毒的检测及株系分化研究[J]. 南方农业学报, 2017, 48(7): 1220-1224.
- [7] 马新颖,汪琳,任鲁凤,等. 10 种植物病毒的基因芯片检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 561-565.
- [8] 孙玉兰,李德新. 新病毒鉴定的分子生物学技术[J]. 病毒学报, 2011, 27(2): 170-175.
- [9] LACROIX C, RENNER K, COLE E, et al. Methodological guidelines for accurate detection of viruses in wild plant species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82: 1966-1975.
- [10] 张晓婷,吴祖建,林奇英,等. 双链 RNA 技术与植物病毒研究

- [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(4): 455-458.
- [11] DALE J L. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease[J]. *Advances in Virus Research*, 1987, 33: 301-326.
- [12] ADAMS I P, MIANO D W, KINYUA Z M, et al. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* causing maize lethal necrosis in Kenya[J]. *Plant Pathology*, 2013, 62(4): 741-749.
- [13] OKADA R, KIYOTA E, MORIYAMA H, et al. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2015, 81(2): 103-107.
- [14] LISITSYN N, WIGLER M. Cloning the differences between two complex genomes[J]. *Science*, 1993, 259(5097): 946-951.
- [15] 战晴晴. 柴胡全长 cDNA 文库和遗传图谱的构建及蚕豆病毒属病毒的鉴定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [16] COOPER B, ECKERT D, ANDON N L, et al. Investigative proteomics: identification of an unknown plant virus from infected plants using mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14(7): 736-741.
- [17] REYES G R, KIM J P. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1991, 5(6): 473-481.
- [18] ALLANDER T, EMERSON S U, ENGLE R E, et al. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(20): 11609-11614.
- [19] ALLANDER T, TAMMI M T, ERIKSSON M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [20] ZHANG T, BREITBART M, LEE W H, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses[J]. *PLoS Biology*, 2005, 4(1): e3.
- [21] 赵西梅. 地黄和白术病毒病原检测及病毒全基因组序列测定与分析[D]. 晋中: 山西农业大学, 2013.
- [22] BADILLO-VARGAS I E, BAKER C A, TURECHEK W W, et al. Genomic and biological characterization of Tomato necrotic streak virus, a novel subgroup 2 ilarvirus infecting tomato in Florida[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(6): 1046-1053.
- [23] CIUFFO M, MAMMELLA M, VALLINO M, et al. Molecular identification and biological characterization of a new potyvirus in lettuce[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(9): 2549-2554.
- [24] SHAHID M S, ABOUGHANEM-SABANADZOVIC N, SABANADZOVIC S, et al. Genomic characterization and population structure of a badnavirus infecting blackberry[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(1): 110-115.
- [25] YASAKI M, HIRANO Y, UGA H, et al. Characterization of a new carmovirus isolated from an Adonis plant[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(2): 501-504.
- [26] 钱亚娟, 徐毅, 周琦, 等. 利用深度测序技术发掘植物病毒资源[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(4): 351-363.
- [27] BARBA M, CZOSNEK H, HADIDI A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology[J]. *Viruses*, 2014, 6(1): 106-136.
- [28] ZENGLER K, PALSSON B O. A road map for the development of community systems (CoSy) biology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(5): 366.
- [29] ADAMS I P, GLOVER R H, MONGER W A, et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(4): 537-545.
- [30] GREEN K J, MOLLOV D, TRAN L T, et al. Characterization of a new tymovirus causing stunting and chlorotic mosaic in naranjilla (*Solanum quitoense*) [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(5): 911-918.
- [31] TANG J, LEBAS B, LIEFTING L, et al. Opium poppy mosaic virus, a new umbravirus isolated from *Papaver somniferum* in New Zealand[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(1): 197-201.
- [32] PETRZIK K, PRIBYLOVÁ J, KOLONIUK I, et al. Molecular characterization of a novel capillovirus from red currant[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(4): 1083-1086.
- [33] PARDINA P E R, BEJERMAN N, LUQUE A V, et al. Complete nucleotide sequence of an Argentinean isolate of sweet potato virus G[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(3): 593-595.
- [34] HU Q, HOLLUNDER J, NIEHL A, et al. Specific impact of tobamovirus infection on the Arabidopsis small RNA profile[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19549.
- [35] MOLNÁR A, CSORBA T, LAKATOS L, et al. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(12): 7812-7818.
- [36] 朱慧, 郭惠珊. 植物中病毒来源的小 RNA 介导的 RNA 沉默[J]. *中国科学(生命科学)*, 2012, 42(1): 29-36.
- [37] PANTALEO V, SILDARELLI P, MIOZZI L, et al. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine[J]. *Virology*, 2010, 408: 49-56.
- [38] LI R, GAO S, HERNANDEZ A G, et al. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37127.
- [39] 何艳. 蔷薇科植物上两种未知病毒的基因组克隆及其分子特性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [40] HE Y, YANG Z, HONG N, et al. Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(5): 449-458.
- [41] 陈莎. 深度测序鉴定玉米病毒及感病玉米组织中小 RNA 分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [42] ROOSSINCK M J. Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses[J]. *Virus Research*, 2017, 239: 82-86.

(责任编辑: 王妮)