分类号：Q939.46 单位代码：10389

密 级： 学 号：S2101702

**福建农林大学博士学位论文**

锦紫苏类病毒的遗传变异及其与寄主之间的关系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 学 科 门 类 | ： | 理学 |
| 一级学科名称 | ： | 生物学 |
| 二级学科名称 | ： | 微生物学 |
| 研 究 方 向 | ： | 分子病毒学 |
| 研 究 生 | ： | 姜冬梅 |
| 指 导 教 师 | ： | 谢联辉 教授 |
|  |  | 李世访 研究员 |

完 成 时 间：二零一三年五月

**Thesis for Doctor’s Degree**

**Genetic diversity of coleus viroids and the relationship with their hosts**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Specialty | **:** | Microbiology |
| Study field | **:** | Molecular Virology |
| Postgraduate | **:** | Dongmei Jiang |
| Advisors | **:** | Prof. Lianhui Xie |
|  |  | Prof. Shifang Li |
| Submitted time | **:** | April, 2011 |

Fujian Agriculture and Forestry University Fuzhou, Fujian

The People‘s Republic of China

**独创性声明**

本人声明，所呈交的学位论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果， 并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位论文作者亲笔签名： 日期：

**论文使用授权的说明**

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅; 学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书 □

不保密，本论文属于不保密。 □

学位论文作者亲笔签名： 日期：

指导教师亲笔签名： 日期：

目 录

[摘](#_Toc686488206)[要](#_Toc686488206) 5

**[Abstract](#_Toc686488207)** 6

[前言](#_Toc686488208) 14

**[1.8](#_Toc686488209)** [本研究的目的及意义](#_Toc686488209) 15

**[2](#_Toc686488210)** [材料和方法](#_Toc686488210) 15

**[2.1](#_Toc686488211)** [材料](#_Toc686488211) 15

**[2.1.1](#_Toc686488212)** [载体和菌种](#_Toc686488212) 15

**[2.1.2](#_Toc686488213)** [仪器](#_Toc686488213) 15

**[2.1.3](#_Toc686488214)** [试剂](#_Toc686488214) 15

**[2.2](#_Toc686488215)** [方法](#_Toc686488215) 16

**[2.2.1](#_Toc686488216)** [类病毒提取方法（](#_Toc686488216)**[LiCl](#_Toc686488216)**[法和](#_Toc686488216)**[Sap-direct](#_Toc686488216)**[法）](#_Toc686488216) 16

**[2.2.2](#_Toc686488217)** [反转录](#_Toc686488217)**[-](#_Toc686488217)**[聚合酶链式反应（](#_Toc686488217)**[RT-PCR](#_Toc686488217)**[）](#_Toc686488217) 16

**[2.2.3](#_Toc686488218)****[PCR](#_Toc686488218)**[产物的纯化](#_Toc686488218) 20

**[2.2.4](#_Toc686488219)** [连接](#_Toc686488219) 21

**[2.2.5](#_Toc686488220)****[D](#_Toc686488220)**[H5α感受态细胞的制备](#_Toc686488220) 21

**[2.2.6](#_Toc686488221)** [转化](#_Toc686488221) 22

**[2.2.7](#_Toc686488222)** [阳性克隆的筛选](#_Toc686488222) 22

**[2.2.8](#_Toc686488223)** [序列分析](#_Toc686488223) 22

**[2.2.9](#_Toc686488224)** [地高辛标记](#_Toc686488224)**[RNA](#_Toc686488224)**[探针的制备](#_Toc686488224) 23

**[2.2.10](#_Toc686488225)** [斑点杂交](#_Toc686488225) 25

**[2.2.11](#_Toc686488226)** [聚丙烯酰胺凝胶电泳（](#_Toc686488226)**[PAGE](#_Toc686488226)**[）](#_Toc686488226) 29

**[3](#_Toc686488227)** [锦紫苏类病毒的两种快速检测方法](#_Toc686488227) 32

**[3.1](#_Toc686488228)****[Sap-direct RT-PCR](#_Toc686488228)** [法](#_Toc686488228) 32

**[3.1.1](#_Toc686488229)** [前言](#_Toc686488229) 32

**[3.1.2](#_Toc686488230)** [样品来源](#_Toc686488230) 32

**[3.1.3](#_Toc686488231)** [不同稀释梯度下类病毒的检测结果](#_Toc686488231) 32

**[3.1.4](#_Toc686488232)** [不同组织中类病毒的检测结果](#_Toc686488232) 32

**[3.1.5](#_Toc686488233)****[Sap-direct RT-PCR](#_Toc686488233)**[法与斑点杂交法比较](#_Toc686488233) 32

**[3.1.6](#_Toc686488234)** [结论](#_Toc686488234) 32

**[3.2](#_Toc686488235)** [通用探针快速杂交法](#_Toc686488235) 33

**[3.2.1](#_Toc686488236)** [前言](#_Toc686488236) 33

**[3.2.2](#_Toc686488237)** [样品来源](#_Toc686488237) 33

**[3.2.3](#_Toc686488238)****[8CCR](#_Toc686488238)**[探针的灵敏度](#_Toc686488238) 33

**[3.2.4](#_Toc686488239)****[8CCR](#_Toc686488239)**[探针的可靠性](#_Toc686488239) 33

**[3.2.5](#_Toc686488240)** [批量检测结果](#_Toc686488240) 33

**[3.2.6](#_Toc686488241)** [结论](#_Toc686488241) 33

**[4.1](#_Toc686488242)** [样品来源](#_Toc686488242) 34

**[4.2](#_Toc686488243)** [检测结果](#_Toc686488243) 34

**[4.3](#_Toc686488244)** [锦紫苏类病毒在中国、印度和印度尼西亚的首次报道](#_Toc686488244) 35

**[4.3.1](#_Toc686488245)****[CbVd-2](#_Toc686488245)**[在中国的首次报道](#_Toc686488245) 35

**[4.3.2](#_Toc686488246)****[CbVd-3](#_Toc686488246)**[在中国的首次报道](#_Toc686488246) 35

**[4.3.3](#_Toc686488247)****[CbVd-1](#_Toc686488247)**[在印度尼西亚的首次报道](#_Toc686488247) 35

**[4.3.4](#_Toc686488248)****[CbVd-5](#_Toc686488248)**[在印度和印度尼西亚的首次报道](#_Toc686488248) 35

**[4.4](#_Toc686488249)** [结论](#_Toc686488249) 35

**[5.1](#_Toc686488250)** [前言](#_Toc686488250) 35

**[5.2](#_Toc686488251)** [方法](#_Toc686488251) 35

**[5.2.1](#_Toc686488252)** [侵染性克隆的构建及](#_Toc686488252)**[RNA](#_Toc686488252)**[体外转录](#_Toc686488252) 35

**[5.2.2](#_Toc686488253)** [体外转录产物接种](#_Toc686488253) 36

**[5.2.3](#_Toc686488254)** [类病毒](#_Toc686488254)**[RNA](#_Toc686488254)**[提取](#_Toc686488254) 36

**[5.2.4](#_Toc686488255)** [接种植物中](#_Toc686488255)**[CbVds](#_Toc686488255)**[的检测](#_Toc686488255) 36

**[5.2.5](#_Toc686488256)****[CbVd-5](#_Toc686488256)**[和](#_Toc686488256)**[CbVd-6](#_Toc686488256)**[种传实验](#_Toc686488256) 36

**[5.2.6](#_Toc686488257)** [克隆测序及序列分析](#_Toc686488257) 36

**[5.3](#_Toc686488258)** [结果](#_Toc686488258) 36

**[5.3.1](#_Toc686488259)****[CbVds](#_Toc686488259)**[侵染性克隆的构建](#_Toc686488259) 36

**[5.3.2](#_Toc686488260)****[CbVds](#_Toc686488260)**[二倍体体外转录产物的侵染性](#_Toc686488260) 36

**[5.3.3](#_Toc686488261)****[CbVds](#_Toc686488261)**[子代序列分析](#_Toc686488261) 36

**[5.3.4](#_Toc686488262)****[CbVd-5](#_Toc686488262)**[和](#_Toc686488262)**[CbVd-6](#_Toc686488262)**[种传实验结果](#_Toc686488262) 37

**[5.4](#_Toc686488263)** [结论](#_Toc686488263) 37

**[6](#_Toc686488264)** [全文总结](#_Toc686488264) 37

**[6.1](#_Toc686488265)****[CbVds](#_Toc686488265)**[快速检测方法的建立](#_Toc686488265) 37

**[6.2](#_Toc686488266)****[CbVds](#_Toc686488266)**[发生分布调查](#_Toc686488266) 37

**[6.3](#_Toc686488267)** [锦紫苏类病毒与寄主](#_Toc686488267) 37

[参考文献](#_Toc686488268) 37

[附录](#_Toc686488269)**[1](#_Toc686488269)** [个人简介](#_Toc686488269) 43

[附录1 个人简介](#_Toc686488270) 43

摘 **要**

类病毒本身不编码任何蛋白，而是完全依靠寄主的相关酶类进行自我复制。锦紫苏是世界范围内广泛种植的一种观赏植物，原产于印度尼西亚，其茎叶繁茂，鲜嫩多汁。锦紫苏极其容易受到马铃薯类病毒科锦紫苏类病毒属内各种类病毒的侵染。目前为止，世界上共发现了6种侵染锦紫苏的类病毒，分别为：锦紫苏类病毒-1～6（CbVd-1～CbVd-6）。锦紫苏类病毒侵染锦紫苏后在某些品种上可能呈潜伏侵染，不引起任何的症状，也可能会在某些品种上引起植株矮化或叶片轻度萎黄等症状。所有已发现的锦紫苏类病毒具有共同的中央保守区序列，而且锦紫苏类病毒具有广泛重组的特性。虽然CbVd-1已被证明广泛存在于世界各国，但其他五种锦紫苏类病毒的相关信息却十分有限，特别是CbVd-5和CbVd-6，目前还没有关于这两种类病毒生物学方面的报道。

本研究意在建立两种锦紫苏类病毒快速检测方法，调查锦紫苏类病毒在全国范围内的发生和分布情况，并对其遗传多样性进行分析，探讨锦紫苏类病毒序列变异和寄主植物品种之间的关系。本研究中得到的锦紫苏类病毒序列将丰富GenBank数据库中类病毒序列相关信息，本研究的结果也将为锦紫苏类病毒重组及致病机制的阐明打下良好的理论基础。

根据所有锦紫苏类病毒具有共同的中央保守区这一特性，本研究建立了两种锦紫苏类病毒快速检测方法，分别为Sap-direct RT-PCR法和通用探针快速杂交法。Sap-direct RT-PCR法中，利用移液器直接吸取锦紫苏茎和叶的汁液作为RT-PCR的模板，根据锦紫苏类病毒中央保守区序列设计可以扩增所有锦紫苏类病毒的通用引物，通过一次PCR就可以确定被检植株是否感染了锦紫苏类病毒以及感染类病毒的种类。通用探针快速杂交法中，将锦紫苏类病毒中央保守区上游的

32个相同的核苷酸序列扩增8倍后用于制备检测所有锦紫苏类病毒的通用探针—8CCR探针。该探针可以通过斑点杂交一次性确定样品中是否携带锦紫苏类病毒，通过Northern杂交技术可以一次性确定样品中感染锦紫苏类病毒的种类。这两种快速检测方法简单高效，成本较低，适用于锦紫苏类病毒的批量检测及大规模调查，对其他类病毒，甚至病毒快速检测方法的建立也具有借鉴意义。

锦紫苏类病毒疫情普查研究中，从中国、印度及印度尼西亚共采集888个锦紫苏样品。检测结果表明：CbVd-1和CbVd-5广泛存在于这三个国家中；CbVd-2, CbVd-3和CbVd-6仅在中国样品中检测到；所有的样品中均没有检测到CbVd-4。本研究结果是CbVd-1和CbVd-5在印度尼西亚的首次报道，CbVd-2和CbVd-3在中国的首次报道，也是CbVd-5在印度的首次报道。

锦紫苏类病毒生物学活性研究中，利用侵染性克隆技术，首次确认了CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6中国地区分离物的生物学活性。研究结果表明：不同锦紫苏类病毒在同一种

寄主植物中的侵染时间从45天到300天不等，确认了CbVd-5和CbVd-6的生物学活性，为其分类地位的确立提供了确凿的分子生物学证据。子代序列分析结果表明：锦紫苏类病毒的遗传多样性不仅与寄主的种类有关，也与类病毒自身的种类有关。另外，本研究还确认了CbVd-5和CbVd-6可以通过种子进行传播。

**关键词：**锦紫苏； 类病毒； 寄主； 侵染性克隆； 子代序列

**Abstract**

Viroids, the smallest autonomous infectious nucleic acids known today, do not encode any protein and depend completely on host enzymes for replication. *Coleus blumei* (coleus), which was found originally in Indonesia, is an ornamental plant grown worldwide, and both its stem and leaf are known to be succulent. Coleus is susceptible to infection by several *Coleus blumei viroids* (CbVds) species in the genus *Coleviroid*, family *Pospiviroidae*. Up to now, six main viroids infecting coleus have been

Reported: *Coleus blumei viroid*-1～*Coleus blumei viroid*-6 (CbVd-1～CbVd-6). The CbVd infection

Can be either asymptomatic or symptomatic including dwarfing or slight chlorosis, depending on the cultivar. As members of the family *Pospiviroidae*, all of the six known coleus viroids share a common central conserved region (CCR) sequence and recombination among the coleus viroids are common. Although CbVd-1 has been reported in many countries in the world, the information of the other five coleus viroids are limited and no specific bioassays have been established for CbVd-5 and CbVd-6.

The present study intends to develop rapid detection methods for coleus viroids, investigate the occurrence and distribution of CbVds in China, analyze the genetic diversity of CbVds and study the relationship between CbVd sequences and host cultivars. The sequence information of coleus viroids in this study would be enriched in GenBank, and our studies would be of great significance to the clarification of recombination and pathogenicity mechanism for coleus viroids.

Here, two rapid detection methods, Sap-direct RT-PCR method and rapid hybridization method were developed for coleus viroids. In the Sap-direct RT-PCR method, the sap directly obtained from coleus plants using a pipettor were used as the template of RT-PCR and a pair of universal primers for CbVds was designed to detect all the coleus viroids. In the hybridization method, a universal probe (8CCR-probe), which was performed using an octamer of 32-nucleotide sequence derived from the CCR region of coleus viroids, can be used to detect at least four coleus viroids by Dot-blot and northern hybridization simultaneously. Both of the two rapid detection methods for coleus viroids are reliable, rapid and low-cost, and they are effective ways to survey the occurrence of coleus viroids and provide reference for the development of rapid detection method for other viroids, and even viruses.

888 coleus samples were collected from China, India and Indonesia. Detection results demonstrated that CbVd-1 and CbVd-5 have been widely spread in the three countries, and CbVd-2, CbVd-3 and CbVd-6 have only been detected in China. All the samples were negative to CbVd-4. The results in this study are the first reports of CbVd-1 and CbVd-5 in Indonesia, the first reports of

CbVd-2 and CbVd-3 in China, and the first report of CbVd-5 in India.

In this study, the biological properties of CbVd-1, CbVd-3, CbVd-5 and CbVd-6 were confirmed using infectious clones as inoculum sources. The first detection time for the four CbVds was distinctl y different, ranging from 45 days to 300 days. Molecular characterization of their progenies revealed that the genetic diversity of CbVds populations is not only dependent on the infected host species, but also on the viroid species. In addition, we also confirmed that CbVd-5 and CbVd-6 can be transmitted via seeds.

**Keywords:** Coleus; Viroid; Host; Infectious clones; Progeny sequence

**1.1****类病毒**

**1 前言**

早在1922年，美国就发现了一种严重影响马铃薯产量的马铃薯纺锤形块茎病（Potato spindle tube disease, PSTD）。1960年以来，我国的黑龙江省也发现了这种病害，而且此病害曾造成马铃薯减产20～70%。这种病害过去一直被认为是病毒病，但始终观察不到病毒粒体。在美国工作的瑞士学者T. O. Diener教授经过研究，于1971年证实了引起这类病害的病原物是一种不具有蛋白质外壳，仅有RNA组成的新病毒，称之为马铃薯纺锤形块茎―类病毒‖，并提出了―类病毒‖的概念

(Diener, 1971; Diener, 2003; Flores et al., 2005; Ding, 2009)。

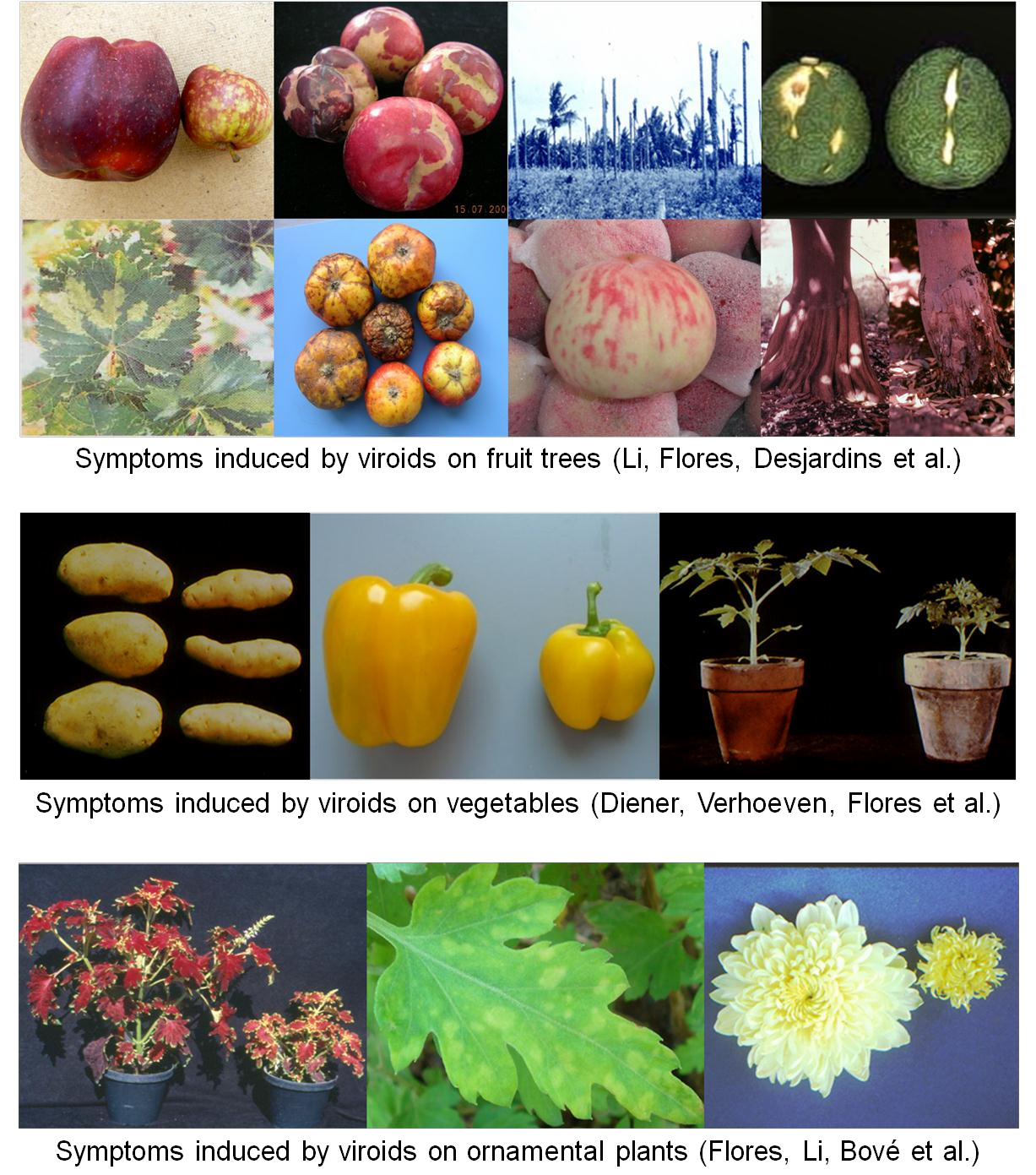


图1-1 类病毒在果树、蔬菜和观赏植物上引起的症状

Fig. 1-1 Symptoms induced by viroids on fruit trees, vegetables and ornamental plants

类病毒（Viroid）是迄今为止发现的最小病原物，可侵染许多重要的果树（杏、桃、扁桃、李、柑桔、苹果、樱桃、梨等）、经济作物（啤酒花、马铃薯）、观赏植物（菊花、锦紫苏）以及蔬菜

（番茄、黄瓜）等。类病毒侵染植物后引起的常见症状有：植株矮化；叶片卷曲、上翘；果实扭曲、褪色；茎叶坏死等，除此之外还有裂皮、斑果等症状[（图1-1](#_bookmark4)）。类病毒引起的症状发展速度慢，潜伏期长，而且因环境和寄主种类的不同而不同。在农业生产上，类病毒曾经对农作物造成严重危害：例如马铃薯纺锤块茎类病毒（PSTVd）能够造成马铃薯近乎70%以上的减产；椰子死亡类病毒（CCCVd）能够降低椰子的数量和果实大小，严重时曾导致菲律宾的椰子近乎绝产；鳄梨日斑类病毒（ASBVd）和苹果锈果类病毒（ASSVd）都能给果树生产带来严重危害；锦紫苏类病毒（CbVd）和菊花矮化类病毒（CSVd）能够严重降低花卉的观赏和药用价值。

**1.2****分类和结构**

类病毒是一类单链共价闭合环状的裸露RNA分子，由246～401个核苷酸组成（大约相当于最小RNA病毒基因组的十分之一），具有自我复制能力，是感染某些高等植物的低分子致病性因子。类病毒具有环状结构，自然状态下，类病毒RNA以高度碱基配对的折叠结构形式存在。类病毒是具有功能的RNA分子，本身不编码任何蛋白，在其结构基础上直接发挥其功能，依赖寄主的各种因子完成其侵染过程（Fauquet et al., 2005; Flores et al., 2005; Ding, 2009）。

**1.2.1****分类**

界定类病毒新种的标准为序列相似性低于90%且具有独特的生物学活性。目前已知的类病毒有39 种，根据其结构及序列同源性可分为两个科（[表1-1](#_bookmark7)）：一是马铃薯纺锤块茎类病毒科

（*Pospiviroidae*），以马铃薯纺锤形块茎类病毒为代表，该科的类病毒具有中央保守区（CCR），二级结构分为五个功能区，但不具有核酶活性；另一个是鳄梨日斑类病毒科（*Avsunviroidae*），以鳄梨日斑类病毒（ASBVd）为代表，该科的类病毒具有核酶活性但不具有中央保守区，（+）链和（-）链均可通过锤头状的核酶结构进行自我剪切，在复制过程中由多聚中间体形成单体分子（Fauquet et al., 2005）。如[表1-1](#_bookmark7)所示，马铃薯纺锤块茎类病毒科中包含5个属，35种类病毒；鳄梨日斑类病毒科包含3个属，4种类病毒。一般来说，与鳄梨日斑类病毒科中的类病毒相比，马铃薯纺锤块茎类病毒科中类病毒的寄主范围较广（Rosemarie and Rober, 2006）。

表1-1 类病毒的分类（King et al., 2011）Table 1-1 Classification for viroids (King et al., 2011)

| 马铃薯纺锤块茎类病毒科（Pospiviroidae） | | |
| --- | --- | --- |
| 属 | 种 | 缩写 |
| Pospiviroid | 马铃薯纺锤块茎类病毒（Potato spindle tuber viroid） | PSTVd |
| 菊花矮化类病毒（Chrysanthemum stunt viroid） | CSVd |
| 柑桔裂皮类病毒（Citrus exocortis viroid） | CEVd |
| 金鱼花潜隐类病毒（Columnea latent viroid） | CLVd |
| 血苋类病毒（Iresine viroid） | IRVd |
| 墨西哥心叶茄类病毒（Mecican papita viroid） | MPVd |
| 番茄顶缩类病毒（Tomato apical stunt viroid） | TASVd |
| 番茄褪绿矮缩类病毒（Tomato chlorotic dwarf viroid） | TCDVd |
| 番茄雄性株类病毒（Tomato planta macho viroid） | TPMVd |
| 辣椒小果类病毒（Pepper chat fruit viroid） | PCFVd |
| Apscaviroid | 苹果锈果类病毒（Apple scar skin viroid） | ASSVd |
| 苹果凹果类病毒（Apple dimple fruit viroid） | ADFVd |
| 苹果皱果类病毒（Apple/citrus junos fruit viroid） | ACJVd |
| 澳洲葡萄类病毒（Australian grapevine viroid） | AGVd |
| 葡萄黄痘类病毒-1(Grapevine yellow speckle viroid-1) | GYSVd-1 |
| 葡萄黄痘类病毒-2(Grapevine yellow speckle viroid-2) | GYSVd-2 |
| 葡萄黄痘类病毒-3(Grapevine yellow speckle viroid-3) | GYSVd-3 |
| 柑桔卷叶类病毒（Citrus bent leaf viroid） | CBLVd |
| 柑桔类病毒 I 号（Citrus viroid I LSSI） | CVd LSS |
| 柑桔类病毒 II 号（Citrus viroid II） | CVd II |
| 柑桔类病毒 III 号（Citrus viroid III） | CVd III |
| 柑桔类病毒 OS(Citrus viroid OS) | CVd OS |
| 日本柑桔类病毒 I(Japanese citrus viroid I) | JCVd |
| 梨疱状溃疡类病毒（Pear blister cancer viroid） | PBCVd |
| Hostuviroid | 啤酒花矮化类病毒（Hop stunt viroid） | HSVd |
| Cocadviroid | 柑桔类病毒 IV 号（Citrus viroid IV） | CVd IV |
| 椰子死亡类病毒（Coconut cadang-cadang viroid） | CCCVd |
| 椰子败生类病毒（Coconut tinangaja viroid） | CtiVd |
| 啤酒花潜隐类病毒（Hop latent viroid） | HLVd |
| Coleviroid | 锦紫苏类病毒-1(Coleus blumei viroid-1) | CbVd-1 |
| 锦紫苏类病毒-2(Coleus blumei viroid-2) | CbVd-2 |
| 锦紫苏类病毒-3(Coleus blumei viroid-3) | CbVd-3 |
| 锦紫苏类病毒-4(Coleus blumei viroid-4) | CbVd-4 |
| 锦紫苏类病毒-5(Coleus blumei viroid-5) | CbVd-5 |
| 锦紫苏类病毒-6(Coleus blumei viroid-6) | CbVd-6 |
| 鳄梨日斑类病毒科 Avsunviroidae | | |
| 属 | 种 | 缩写 |
| Avsunviroid | 鳄梨日斑类病毒（Avocado sunblotch viroid） | ASBVd |
| 菊花褪绿斑驳类病毒（Chrysanthemum chlorotic mottle viroid） | CChMVd |
| Pelamoviroid | 桃潜隐花叶类病毒（Peach latent mosaic viroid） | PLMVd |
| Elaviroid | 茄潜隐类病毒（Eggplant latent viroid） | ELVd |

**1.2.2****结构**

马铃薯纺锤块茎类病毒是马铃薯纺锤块茎类病毒科的代表种（Diener, 1972; Gross et al.，

1978），体外实验结果证明：该科的多数类病毒具有分子内双链区和内环相间排列的棒状二级结构

（Sanger et al., 1976; Dingley et al., 2003），具有五个结构功能区（Keese and Symons, 1985; Sano et al., 1992）。

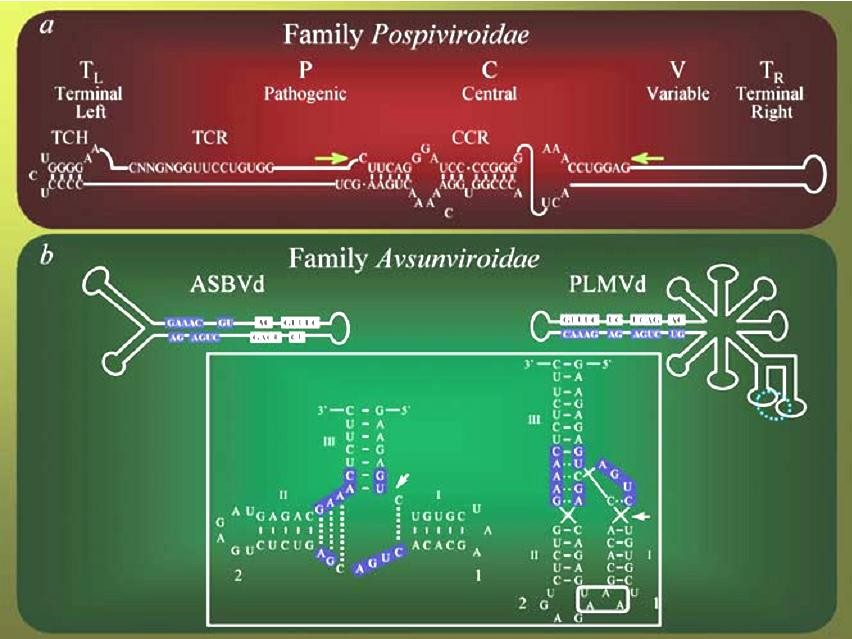


图1-2 类病毒二级结构示意图（Flores et al., 2005）

Fig. 1-2 Schematic diagram of proposed secondary structure of viroids(Flores et al., 2005)

（a）马铃薯纺锤块茎类病毒科类病毒的二级结构示意图。箭头表示CCR上游链形成发夹结构的侧翼序列，S形环连接的是紫外交联后形成的E环（Loop E）结构中相连的两个核苷酸碱基。

（b）鳄梨日斑类病毒科中ASBVd的类棒状二级结构和PLMVd的分支状二级结构示意图。带有蓝色和白色背景的碱基是形成锤头状核酶结构的保守序列；箭头表示的是自我剪切的位点；连续的和不连续的线分别表示Watson-Crick碱基对和非标准碱基对。

[如图1-2](#_bookmark9)所示，对于马铃薯纺锤块茎类病毒科中的类病毒而言，CCR是最为保守的区域，其上游含有一个反向重复序列，能形成茎环结构，该区域被认为是类病毒复制过程中最重要的控制区。如[图1-3](#_bookmark10)所示，左末端区域（the Left Terminal region, TL）与决定类病毒致病性的构造因子有关，而右末端区域（the Right Terminal region, TR）则是通过控制类病毒的复制量来调节致病性强

弱（Schnolzer et al., 1985; Sano et al., 1992; Sano and Ishiguro, 1998）；此外，TL区和TR区在不同类病毒之间可以互换，因此它们引发的基因重组在类病毒进化中扮演着重要角色（Hammond, 1994;

Maniataki et al., 2003）。CCR的性质和末端保守区的缺失与否是类病毒种间毒性水平差异的关键因素。致病区（Pathogenicity region, P）与类病毒导致的植物病害症状之间有密切关系，如CEVd中，

P区起调节致病性强弱的作用（Visvader and Symons, 1986）。可变区（Variable region）与类病毒的复制有关，其变异程度较大，即使是很相近的类病毒，相似性也都很低（Diener, 1986）。



图1-3 类病毒不同结构域与其可能的功能

Fig. 1-3 Structural domains and their proposed functions

马铃薯纺锤块茎类病毒科的类病毒序列为不完全回文序列，能形成无分支的、稳定的、由一系列短的茎环组成的棒状二级结构（Baumstark and Riesner, 1995）。鳄梨日斑类病毒科包含4种类病毒，它们之间的序列相似性较低，具有锤头状的核酶保守区，其正负链都可以被锤头状核酶自我切割。然而，由于能形成分支状的二级结构和RNA不溶于2 M氯化锂（LiCl）的特性，桃潜隐花叶类病毒（PLMVd）和菊花褪绿斑驳类病毒（CChMVd）归为同一个属（Hernandez and Flores, 1992; Navarro and Flores, 1997; De la Pena et al., 1999）。鳄梨日斑类病毒科的类病毒能够进一步形成不同的结构，以维持热力学平衡和动力受限过程中的亚稳定状态，在稳定或亚稳定结构中，有很多的结构原件都与生物学功能相关（Navarro and Flores, 1997; Bussiere et al., 2000; Flores et al., 2000b; Navarro and Flores, 2000; Fadda et al., 2003）。

**1.3****复制和移动**

**1.3.1****复制**

与病毒类似，类病毒作为病原物在寄主体内进行复制，而与病毒不同，类病毒本身不能编码任何蛋白，完全依赖于寄主细胞的酶系统以滚环模式进行复制，得到大量首尾相接的复制中间体。此复制模式的提出有以下两点证据：1、类病毒复制的起始模板是环状的；2、被侵染组织中存在类病毒RNA寡聚体的正负链，此寡聚体被认为是不断重复转录的产物（Branch and Robertson, 1984; Branch et al., 1988; Feldstein et al., 1998）。



图1-4 类病毒的复制模式示意图

Fig. 1-4 Schematic for the pathways of viroid replication

马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒分别采用非对称和对称式的滚环复制模式进行复制。红线和蓝线分别表示正负链，红线和蓝线上的黑色部分表示剪切、连接位点

([http: //eureka. kpu. ac. jp/~y\_kubo/pathology/viroid%20Ver1. pdf](http://eureka.kpu.ac.jp/%7Ey_kubo/pathology/viroid%20Ver1.pdf))。



图1-5 马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒在细胞中复制的位置

Fig. 1-5 Location of viroids in the family of*Avsunviroidae* and *Pospiviroidae*

马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒分别在细胞核内和叶绿体中进行复制

（[http: //eureka. kpu. ac. jp/~y\_kubo/pathology/viroid%20Ver1. pdf](http://eureka.kpu.ac.jp/%7Ey_kubo/pathology/viroid%20Ver1.pdf)）。[图1-4](#_bookmark13)展示的是类病毒复制的两种

不同模式：以PSTVd为代表的马铃薯纺锤块茎类病毒科的类病毒在细胞核内（[图1-5](#_bookmark14)）利用DNA依赖的RNA聚合酶II以非对称式滚环复制模式进行复制（Branch and Robertson, 1984; Branch et al., 1988; Feldstein et al., 1998）；以ASBVd为代表的鳄梨日斑类病毒科的类病毒在叶绿体内利用细胞核编码的叶绿体RNA聚合酶或质体编码的RNA聚合酶以对称式滚环模式进行复制（Flores et al., 2000a; Gora-Sochacka, 2004; Tabler and Tsagris, 2004; Flores et al., 2005），此模式最初只停留在理论阶段（Branch and Robertson, 1984），后来利用ASBVd（Hutchins et al., 1985; Daros et al., 1994）和PLMVd（Bussiere et al., 1999）得到的实验结果证实该理论是正确的（[图1-5](#_bookmark14)）。

[如图1-5](#_bookmark14)所示，非对称式滚环复制模式中，类病毒首先以环状单链RNA为模板转录成（-）链寡聚体，此（-）链寡聚体作为复制中间体，不经过剪接，直接作为模板转录成（+）链寡聚体，最终被核糖核酸酶剪切为单位长度的RNA分子并通过环化形成类病毒分子。对称式滚环复制模式中，类病毒首先以环状单链RNA为模板转录成（-）链寡聚体，而后被剪切成单位长度的线状（-）链分子，自我环化后以环化的（-）链分子为模板转录出（+）链寡聚体，最终通过进一步剪切环化，形成类病毒分子（Hutchins et al., 1985; Daros et al., 1994; Bussiere et al., 1999）。

**1.3.2****移动**

****

图1-6 类病毒RNA分子在植物体内移动的模式图（Ding et al., 2005）Fig.1-6 Schematic for the movement of viroid RNAs (Ding et al., 2005)

类病毒侵染寄主植物是一个分步骤的复杂过程：类病毒首先进入寄主细胞的复制位点，复制完成后，类病毒及其子代从该位置移出并侵入相邻细胞，最后类病毒从一个组织进入到另一个组织，直到侵染整株植物。鳄梨日斑类病毒科的代表种ASBVd在叶绿体中进行复制，而马铃薯纺锤块茎类病毒科的代表种PSTVd在细胞核中进行复制，因此他们复制过程中出入的细胞器及出入途径等不同[（图1-6](#_bookmark16)）。虽然类病毒的复制及移动机制还不清楚，但毫无疑问，类病毒是通过胞间连丝向相邻细胞移动，通过韧皮部维管组织实现长距离运输（Palukaitis, 1987; Ding et al., 1997，

2005）：当类病毒进入到一个易感宿主细胞后，类病毒首先要通过细胞质，才能进入到细胞核（马铃薯纺锤块茎类病毒科类病毒）或叶绿体（鳄梨日斑类病毒科类病毒）进行复制。复制完成后，新合成的子代类病毒也要首先返回到细胞质中，再通过胞间连丝进入相邻细胞，然后通过韧皮部的维管组织，进入未被侵染的组织中，最终完成系统侵染（Flores et al., 2011）。

**1.4****类病毒与寄主**

**1.4.1****不同类病毒的寄主范围**

马铃薯纺锤块茎类病毒科中多数类病毒（如PSTVd、HSVd、CEVd等）寄主范围较广，都能够侵染禾本科及木本科植物；该科中有些类病毒的寄主范围也比较窄，比如，目前为止，锦紫苏是6种锦紫苏类病毒唯一的自然寄主。鳄梨日斑类病毒科的类病毒寄主范围普遍较窄，这可能是由于它们在叶绿体中进行复制的缘故（Flores et al., 2011）。对于特定的类病毒，其侵染特定寄主的能力不仅仅决定于寄主的性质，也可能与类病毒自身的序列等有关。Wassenegger等人证明一个核苷酸的置换能将PSTVd从对烟草无侵染性变为有侵染性（Wassenegger et al., 1996）。对柑橘类病毒的研究结果表明：某种类病毒在抗感品种的柑橘上复制和累积效率非常低，然而，当把此柑橘嫁接到易感品种的柑橘上后，类病毒的复制和累积效率大大增加，能同时侵染砧木和接穗。

(Bani-Hashemian et al., 2010)。

**1.4.2****寄主特异性变异**

由于类病毒复制过程中，RNA聚合酶具有很高的突变率，而且类病毒的复制也会受到寄主的选择压力，因此，类病毒在寄主体内是以准种形式存在的，即类病毒是一个包含序列相近但又不同的多个变体的群体（Flores et al., 2011）。近年来，有研究表明：由于校正功能缺失的叶绿体DNA依赖的RNA聚合酶是以RNA而不是其本身的DNA为模板进行校正，CChMVd复制过程中，每

400个核苷酸就会有1个变异。不同寄主的选择压力各不相同，例如，连续多年接种后，从不同寄主上分离到的CEVd 种群结构不同，在核苷酸序列、生物学活性以及浓度上都显示出多样性

（Semancik et al., 1993）；对HSVd的进化分析结果表明：HSVd具有明显的寄主特异性（Kofalvi et al., 1997; Amari et al., 2001）。另外，连续十余年的研究表明：不同的柑橘寄主在CEVd种群结构形成过程中扮演着重要角色，将相同的CEVd接种源接种到两个不同品种的柑橘上以后，与接种源序列相比，序列发生了变异，而且其后代的种群结构具有明显的寄主特异性（Bernad et al., 2009）。长期（25年）和短期（1年）的连续实验结果表明：以一个CDVd分离物作为接种源接种不同的柑橘寄主，其子代的CDVd种群的遗传多样性决定于其侵染寄主的品种（Tessitori et al., 2013）。

理论上讲，类病毒能够很容易侵染寄主植物的各个组织，然而，近来研究表明：类病毒的侵染部位可能仅局限于韧皮部，至少这一现象在某些―类病毒-寄主‖的模式系统中得到了证明，也许

寄主中存在某种屏障阻碍了类病毒从维管束鞘向邻近组织细胞的移动（Bani-Hashemian, 2009）。2007年，Rodio等的研究结果表明：寄主植物的顶端分组织中不存在PLMVd，虽然RNA沉默可能是其原因，但目前还是普遍认为可能是由于分生组织和其他植物组织、器官之间没有维管束连接的缘故（Rodio et al., 2007）。

**1.4.3** **RNA沉默在类病毒致病机制中的作用**

RNA沉默是一种广泛存在于生物体内的保守机制，在植物抗病毒/类病毒过程中具有重要作用，它最显著的特征就是能产生具有序列特异性调控功能的小RNA（sRNA）分子（Ding, 2000）。病毒/类病毒作为病原物，能在寄主上引起各种不同的症状，在其复制过程中，会产生可折叠发夹结构的单链RNA分子、双链RNAs以及分子内部高度结构化的RNA分子等RNA前体，这些RNA前体被RNA酶III（Dicer or Dicer-like（DCL）蛋白）识别并加工成真核生物中具有调控功能的18～25 nt大小的sRNA（Chen, 2009），紧接着，这些加工成熟的具有调控功能的sRNA分子被招募到Argonaute（AGO）蛋白中形成一个由多亚基组成、RNA诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex, RISC），最后，sRNA分子指导RISC以序列特异性方式对靶标进行调控（Flores et al., 2011）。一方面，植物RNA沉默机制的主要功能之一是抗病毒/类病毒作用，寄主细胞能够产生病毒/类病毒来源的sRNAs，病毒/类病毒侵染之前，在未被侵染的细胞内靶向病毒RNA，引发基因沉默，从某种意义上可以说，是病毒/类病毒的侵染诱导了RNA沉默。另一方面，为了抵御这种基于RNA沉默的防御机制，许多植物病毒/类病毒都编码了沉默抑制子蛋白（Ding and Voinnet, 2007; Csorba et al., 2009）。

植物及其它一些生物体内，RNA沉默效应能够通过RNA依赖的RNA聚合酶（RDR）等因子进行放大，例如，拟南芥（*Arabidopsis, A. thaliana*）有6个RDR蛋白参与RNA沉默，这些RDR蛋白要发挥效应还需借助Dicer或Dicer-like酶以及AGO蛋白的协助，目前研究表明，拟南芥中有10个AGO蛋白（AGO1～AGO10）（Voinnet, 2008）。病毒dsRNA或ssRNA等RNA前体可以被4种不同的DCL蛋白（DCL1～DCL4）加工成不同大小的sRNA. DCL1能够加工产生大小不同的micro RNAs (miRNAs)，但其具体功能并不明确（Voinnet, 2008）；DCL2和DCL4分别加工转录过程中生成的双链RNAs产生21和22 nt的小干扰RNA(siRNA)（Dunoyer and Voinnet, 2009）；

DCL3能够产生与异染色体关联的24 nt的siRNAs，用以协调特定RNA介导的DNA甲基化（Verdel et al., 2009）；DCL2、DCL3和DCL4能够产生不同大小的特定siRNA，因此，RDR和DCL功能的耦合为在全基因组水平上检测特定RDR活性提供了一个更为有效的途径（Di Serio et al., 2010）。

虽然类病毒RNA是单链的，在寄主体内，马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒都能产生大量的21～24 nt大小的类病毒来源的sRNA分子（vd-sRNAs），近年来研究表明，

类病毒的侵染均伴随着vd-sRNAs的出现，这说明也许这些小RNA分子来自复制中间体（Hammann and Steger, 2012）。多个研究小组的研究结果证明，被马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒侵染的植株中都积累了大量的的vd-sRNAs，这说明类病毒与寄主的互作关系中存在

RNA沉默((Itaya et al., 2001; Papaefthimiou et al., 2001; Martınez de Alba et al., 2002). vd-sRNAs可能是类病毒致病过程中的关键效应分子，或者在其侵染过程中，类病毒通过跟寄主竞争寄主体内的酶类用于合成miRNAs和siRNAs，以利用这些分子调控致病路径，从而引起植物的发病症状。

（Papaefthimiou et al., 2001; Wang et al., 2004; Gomez et al., 2008, 2009; Schwind et al., 2009; Di Serio et al., 2010）。类病毒可能是RNA沉默的触发器和靶标，同时，类病毒也可能产生某些抑制蛋白，从而使得类病毒能够逃脱植物的RNA沉默防御机制（Flores et al., 2011）。

最初，只是几个不同的实验室利用杂交方法分析了某个特定寄主中vd-sRNA 的群体结构

（Matoušek et al., 2007），也许是由于研究的―类病毒—寄主‖的模式系统和所用方法的局限性，虽然在马铃薯纺锤块茎类病毒科和鳄梨日斑类病毒科的类病毒侵染的植株中发现了一些vd-sRNAs的变体，但是并没有证据表明vd-sRNAs的含量水平等与类病毒全长序列、症状的发生之间有必然的联系（Itaya et al., 2001; Papaefthimiou et al., 2001; Martníez et al., 2002; Markarian et al., 2004）。然而，被侵染植株中vd-sRNA的出现可以看作是一个永恒的研究课题，高通量测序技术的发展也将会进一步揭示这些小RNA分子的起源和可能的作用（Hammann and Steger, 2012）。近年来，一系列的高通量测序结果显示，无论是被细胞核内还是叶绿体内复制的类病毒侵染后，植物组织中源自类病毒正负链的vd-sRNAs似乎都累积到比较高的水平，并且在类病毒全长序列上特定的片段上集中形成热点区域，然而，vd-sRNAs与类病毒二级结构的类型之间似乎并没有必然的联系，有意思的是，虽然vd-sRNAs在类病毒的正负链上是不均衡分布的，但是不同大小的vd-sRNAs都可以集中到每一个热点区域，这说明几个DCLs可以作用于相同的类病毒RNA区域（Navarro et al., 2009; Di Serio et al., 2009, 2010; Bolduc et al., 2010; Martınez et al., 2010）。无论是马铃薯纺锤块茎类病毒科还是鳄梨日斑类病毒科的类病毒，只有在侵染植物时才能从被侵染植株中检测到

sRNA，但是vd-sRNAs如何干扰植物正常的基因表达并最终引起植物病害的途径和机理有待进一步的研究（Hammann and Steger, 2012）。

**1.5****传播和防治**

**1.5.1****传播**

田间和温室中的研究结果均证明类病毒易通过修剪、嫁接、摩擦等机械方式进行传播，也可以通过人手接触等进行有效传播，还可以通过相邻植株之间块茎、叶芽和叶片的汁液接触进行传播，而且修剪和嫁接似乎是类病毒最常见的传播方式（Flores et al., 2011）。

虽然类病毒的传播效率很大程度上决定于不同的―类病毒—寄主‖模式系统，但是长久以来的研究结果表明：很多类病毒，如PSTVd、ASBVd、CbVd-1、TCDVd等都可以通过花粉和种子进行传播（Wallace and Drake, 1962; Singh, 1970; Kryczynski et al., 1988; Singh et al., 1991; Singh et al., 1992; Manalo et al., 2000; Barba et al., 2007; Singh and Dilworth, 2009）。类病毒检测方法灵敏度的提高及检测技术的进步，进一步明确了种传在特定类病毒发生流行过程中的作用（Flores et al.,

2011），例如，以前TCDVd被认为不能通过番茄种子进行传播（Singh et al., 1999），然而，近年来的研究表明：RT-PCR法已经从番茄的种子和幼苗中检测到了TCDVd。在过去的几年里，对包括TASVd、CEVd、CbVd-5和CbVd-6在内的几种类病毒的研究结果显示，能够通过种子进行传播的类病毒比预想的要多得多（Antignus et al., 2007; Singh et al., 2009）。值得注意的是，种子中检测到类病毒并不意味着该种子种出的幼苗也携带类病毒，例如，苹果种子的外壳中检测到了

ASSVd，但是该种子种出的苹果幼苗并没有受到类病毒的侵染（Hadidi et al., 1991; Howell et al., 1995; Desvignes et al., 1999）；与之类似，受PLMVd侵染的桃树结出的种子的外皮和核上都检测到了PLMVd，但是在种子种植后长出的幼苗中并没有检测到PLMVd（Barba et al., 2007），这些类病毒可以传到种子上去，但却传不到幼苗上去，这可能是类病毒只存在于种子表面而没有进入到胚胎的缘故。种传和花粉传播的机制目前还不清楚，近来对PSTVd的研究结果显示RNA沉默可能是其机制之一，但是这一理论对PLMVd并不适用（Di Serio et al., 2010; Rodio et al., 2007），因此，种传和花粉传播的机制还需进一步的研究。

长期以来，类病毒可以通过无性繁殖进行有效传播，导致昆虫在类病毒传播过程中的作用一直被人们忽视了。很多研究小组开展了PSTVd能否通过蚜虫进行传播的实验，但是实验结果并不理想，有些实验结果还相互矛盾（Kennedy et al., 1962; Smith, 1972; Schuman et al., 1980; De Bokx and Piron, 1981）。有实验证据表明，可以通过蚜虫进行传播的马铃薯卷叶病毒能够提高PSTVd通过蚜虫进行传播的效率（Salazar et al., 1995），然而，目前为止并没有其他关于类病毒传播需要借助于病毒的例子，因此，类病毒能否虫传以及虫传的机制尚有待进一步的研究（Flores et al., 2011）。

**1.5.2****防治**

目前为止，已经有很多方法被用于类病毒的防治，包括加强作物的检验检疫、包括利用冷/热处理等去除植物材料里的类病毒等物理方法、将某个地区被类病毒侵染的材料完全淘汰等

（Howell et al., 1998）。例如，梨上的ASSVd可以通过体外热处理茎尖脱毒法去除（Postman and Hadidi, 1995）。

利用转基因技术来获得抗类病毒的植物也是防治类病毒的有效手段，而且已经应用于马铃薯上PSTVd的脱毒（Sano et al., 1997; Sano et al., 2003）；然而，考虑到其安全性，转基因植物的大

规模种植还未实施。近年来，茎尖冷冻疗法成为去除病毒等病原物的一个新颖的方法，也许不久的将来此方法可应用于类病毒的脱毒（Wang and Valkonen, 2009）。由于类病毒可以通过机械摩擦等方式进行传播，温室中接触过感染类病毒植株的手、衣服或设备等都可以成为类病毒传播的潜在工具，因此，一个温室中一旦发现被感染的植物材料，温室中所有的部分都需要进行彻底的消毒，包括温室内相关的仪器设备。此外，实时的监控和诊断实验也是必须的，如果一个温室中只种植一种作物或者不同作物隔离种植就更好了。

**1.6****类病毒检测方法**

类病毒是无蛋白外壳包裹的非编码RNA分子，因此，用于检测病毒的血清学方法，如酶联免疫吸附反应（ELISA）等不能用于类病毒的检测。1971 年第一个类病毒PSTVd 发现时（Diener，

1971），用于类病毒检测的方法就比较有限，随着检测技术的不断发展，几个比较有效的类病毒检测方法也随之被应用，包括生物学测定方法以及包括聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）、反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）、核酸杂交等在内的分子生物学方法，这些方法一度成为鉴定类病毒的主要方法。由于检测技术的不断进步，越来越多的类病毒被发现。

**1.6.1****生物学检测**

生物学检测方法是最早被应用于鉴定类病毒病害的方法，而且现在也是类病毒鉴定中的一个重要环节。生物学检测过程中，指示植物被类病毒侵染后能够表现出明显的症状，而且能够使类病毒大量积累，因而，此方法在类病毒的分离和生物学特性研究方面具有重要作用，例如，二十世纪八十年代，日本在啤酒花种植园中建立了以四叶黄瓜（‗suyo'）作为指示植物鉴定啤酒花矮化类病毒（HSVd）的生物学检测方法，此方法非常有效，已经成为有效鉴定HSVd的诊断模式系统。不管类病毒是通过昆虫、无性繁殖还是机械方式进行传播，生物学检测方法都能够根据症状确定指示植物中是否存在病原物。与分子生物学方法相比，生物学检测方法需要能够允许类病毒大量复制和积累并表现明显症状的有效指示植物，因此，症状表现的时间、可信度、是否稳定，光照、温度、营养条件等环境因素，以及是否是多种病原物混合侵染等因素都需要考虑周全。

生物学检测方法可以将病害症状、病原物复制及传播等生物学活性通过指示植物显示出来，是一种比较直观的鉴定方法；但是，由于生物检测方法比较费时费力，对温室的温度、湿度等各方面的培养条件要求都比较高，此方法有时候并不实际。此外，并不是所有的类病毒都有可利用的指示植物，不同种类的类病毒在相同的指示植物上可以引起相似甚至相同的症状，致使仅靠表观症状很难准确地鉴别或区分一种特定的类病毒，因此，除生物学性状以外，病原鉴定必须结合分子杂交、电泳等手段进行综合判断（Huttinga, 1996）。

**1.6.2****聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）**

聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）是一种根据类病毒RNA分子特殊的分子大小和环状结构进行检测的方法，此方法灵敏度较高，特异性较强，最后染色阶段采用银染色时此优点更为突出。由于该方法使用时不需要知道类病毒的核酸序列信息，PAGE成为第一个应用于类病毒检测的分子生物学方法（Morris and Smith, 1977）。该方法的原理是：类病毒在自然状态下形成棒状的二级结构，在非变性条件下，根据分子量大小，类病毒RNA分子的迁移速率与来自寄主的小分子RNA相同，但能够与来自寄主的不同大小的RNA分子和双链RNA分子区分开；在变性（化学试剂/高温变性）条件下，类病毒的RNA碱基对打开，由棒状变成环状，迁移速率变慢，从而与来自寄主的小RNA分子区分开，染色后，凝胶上会呈现出明显的类病毒条带（Schumacher et al., 1983; Hadidi et al., 1990; Hataya, 1999）。包括分子杂交、RT-PCR在内的其他分子生物学方法由于灵敏度更高，很多情况下已经代替PAGE成为类病毒检测的常规方法，但是，由于PAGE不需要知晓类病毒的核苷酸序列，因此该方法在类病毒新种鉴定、样品中类病毒种类及未知环状RNA分子鉴定过程中仍然发挥着重要作用，如对某一柑橘样品的PAGE检测结果显示：该样品中存在5种不同的类病毒，分别是：HSVd、CBLVd、CEVd、CBCVd和CDVd（Serra et al., 2008）。目前，比较常用的PAGE检测方法主要是正反向电泳（R-PAGE）和二维电泳（2D-PAGE）。



图1-7 Return-PAGE示意图（D：感病样品；H：健康样品)

Fig. 1-7 Schematic of Return-PAGE for viroid analysis(D: diseased samples; H: healthy samples)

R-PAGE中，含有类病毒的RNA提取液先与6×上样缓冲液（含二甲苯青和溴酚蓝染料）混合后再进行电泳。首先用1×TBE电泳缓冲液在5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行第一向电泳，第二向电泳时，将缓冲液浓度降至0.125×TBE，颠倒电极方向、增大电压，利用加热板加热电泳板保持高温以利于聚丙烯酰胺凝胶充分变性，通过热[变性和低盐缓冲液完成反向电泳。如图1-7](#_bookmark27)所示，正反向电泳结束后，经过银染色，可以在聚丙烯酰胺凝胶上看到清晰的类病毒条带

(Schumacher et al., 1986)。



图1-8 2D-PAGE示意图

Fig. 1-8 Schematic of 2D-PAGE for viroid analysis

2D-PAGE中，含有类病毒的RNA提取液同样要先与6×上样缓冲液（含二甲苯青和溴酚蓝染料）混合后再进行电泳。第一维电泳过程中，溴酚蓝要跑出5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，在第一维非变性电泳结束后，将类病毒迁移条带沿泳道纵向切下，旋转90℃后平放于第二维中5%变性聚丙烯酰胺凝胶的底部，然后灌入含8M尿素的聚丙烯酰胺变性胶进行第二维电泳，电泳完毕后进行银染色[，如图1-8](#_bookmark28)所示，在植物组织RNAs形成的三角形条带之外能清楚地看到类病毒条带

(Schumacher et al., 1983)。

目前为止，PAGE是类病毒鉴定中不可缺少的检测方法，然而，此方法每次检测样品数量有限，如R-PAGE一次电泳最多可以检测二十几个样品，而2D-PAGE一次只能检测一个样品；此外，虽然PAGE可以检测出未知类病毒的存在，但是并不能确定类病毒的种类，因此，基于序列信息的能够确定类病毒种类的RT-PCR法和分子杂交法迅速发展起来。

**1.6.3****聚合酶链式反应（RT-PCR）**



图1-9 PCR示意图

Fig. 1-9 Schematic for PCR

1983年，Kary Mullis发明了PCR技术，[如图1-9](#_bookmark30)所示，它是一种体外核酸扩增技术，短时间内能获得成千上万的特定DNA片段（Mullis, 1994; Bartlett and Stirling, 2003）。

由于其灵敏度高、特异性强、保真度高，PCR技术已经成为医药和生物学领域不可缺少的分子生物学方法，目前已经广泛应用于DNA克隆、基于DNA序列的进化分析、基因功能分析、遗传病诊断、遗传图谱鉴定以及侵染性病害的检测和诊断等各个领域（Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988; Mullis, 1994）。作为分子生物学研究方法中最为有效的技术手段，PCR能够极大地降低样品量的要求，加快样品的诊断速度，而且不需要放射性探针，因此，PCR技术得到了越来越广泛的应用。



图1-10 反转录（RT）示意图

Fig. 1-10 Schematic for RT

PCR的模板是DNA，然而，很多病原物是RNA，例如类病毒是环状单链RNA分子，因此，

PCR之前要经过一步反转录（Reverse transcription, RT）的过程，如[图1-10](#_bookmark31)所示，将RNA转换为

cDNA后再进行PCR，称之为反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）。目前，常规RT-PCR已经成为类病毒检测中的重要手段，被广泛应用于鉴定RNA转录产物的核苷酸序列，如果明确了一个基因所在的全基因组序列信息，RT-PCR可以用于绘制此基因组中外显子和内含子在基因组中的位置图谱（Hadidi and Yang, 1990）。1 pg到100 pg的总核酸量即可满足PCR或RT-PCR的要求，这意味着PCR的灵敏度要明显高于2D-PAGE、R-PAGE和利用cRNA探针进行的分子杂交方法（Nakahara et al., 1999）。

尽管PCR技术灵敏度高、特异性强、保真度高，但它也有很多缺点。首先，由于其灵敏度非常高，实验室操作时PCR污染的现象时有发生，污染物可能来自细菌、病毒或者自己实验的DNA片段，甚至可能是样品之间的交叉污染，从而造成此方法的假阳性率非常高，因此，PCR操作的实验台要保持清洁，并且与DNA或RNA提取的位置保持独立，PCR操作时选择超净台等洁净的地方或实验台可减少污染的机率。最近发展起来的环介导等温扩增法（LAMP）和实时定量PCR

（real-time PCR）等技术可以很大程度上解决PCR污染的问题（Boonham et al., 2004; Boubourakas

et al., 2009; Monger et al., 2010; Luigi and Faggioli, 2011），然而，这些方法成本较高，难以广泛应用。第二，DNA聚合酶的保真度并不是百分之百准确，错配和缺失等错误在PCR过程中经常发生，虽然一些高保真聚合酶（如*Thermococcus litoralis*中分离到的Vent酶、*Pyrococcus furiosus*中分离到的Pfu酶、*Pyrococcus woesii*分离到的Pwo酶等）具有3‘→5’核酸外切酶活性，但是这些酶由于各种原因在PCR中并不经常使用，而PCR中最广泛应用的Taq酶因缺少3‘→5’核酸外切酶活性而导致在高等真核生物中存在的碱基错配校正功能缺失，因此，某种意义上来说，PCR中序列的准确度依赖于所使用DNA聚合酶的保真度。第三，DNA聚合酶能有效扩增DNA片段的长度有限，一般在2～5 kb左右，因此，如果模板过长，可能会由于DNA聚合酶活性的降低而导致扩增效率降低和序列不准确，虽然PCR过程中补充DAN聚合酶可以解决扩增效率降低的问题，但解决不了序列不准确的问题，因此，长而准确的PCR产物需要借助于更为高效的高保真度聚合酶才能完成。此外，PCR对模板的纯度要求很高，核酸提取过程中残留的包括次生代谢产物、多酚多糖以及聚乙烯吡咯烷酮等物质会阻碍PCR的合成，这些抑制物在PCR进行之前需要去除干净（Koonjul et al., 1999; Shamloul et al., 2002; Hassen et al., 2004; Ragozzino et al., 2004）。

**1.6.4****核酸杂交**

核酸杂交是分子遗传学上被广泛应用的一种重要技术，其基本原理是具有一定同源性的两条核酸单链在一定条件下可按碱基互补原则（A-U和G-C）退火形成双链分子，这个过程具有高度特异性。标准的核酸杂交方法需要制备特异性探针，该探针能从复杂的混合物中识别相关的DNA或RNA序列，并与之结合配对。探针包括DNA探针、RNA探针和寡核苷酸探针等，探针的形式可以是单链的，也可以是双链的，但起作用的只有一条链。传统意义上的DNA探针是通过DNA克隆或PCR方法将带标记的dNTPs掺入到新合成的DNA链中完成探针制备；RNA探针是将含有目的片段的DNA质粒线性化之后，利用RNA聚合酶和带有标记的rNTPs（至少一种碱基被标记）通过体外转录完成探针制备（Melton et al., 1984）；寡核苷酸探针是通过化学方法合成的、非常短（大约15～50个核苷酸）的DNA单链，一般情况下，寡核苷酸探针通常是5‘末端使用32P或其他放射性同位素进行标记（Strachan and Read, 1999）。

核酸探针可使用同位素或非同位素进行标记，传统意义上，核酸杂交一般是利用放射性同位素进行标记，此类同位素包括32P、33P、35S、3H等，这类探针在液体和固体样本中都能很容易被检测到，但对人体危害比较大。近年来，非同位素标记的探针在各个领域得到了越来越广泛的应用（Kricka, 1992）。非同位素标记探针主要包括直接标记法和间接标记法两种。非同位素直接标记法通常包含被荧光或其他化学发光物质修饰过的核苷酸，当暴露在特定波长的光下时会发出荧光。核苷酸荧光标记技术自二十世纪八十年代开始发展，在包括染色体荧光原位杂交、组织原位

杂交、DNA自动测序等各个应用领域都被证明是非常有效的（Strachan and Read, 1999）。非同位素间接标记法通常是以报告基因（如生物素、地高辛等）和核苷酸前体的化学耦合为特征。当报告基因被整合到DNA中以后，它能够被亲和分子（链霉亲和素或地高辛特异性抗体）特异性识别并绑定，此亲和分子中含有荧光基团或碱性磷酸酶等偶联物，根据偶联物的不同，利用荧光检测、化学发光或显色法将探针杂交的位置显示出来（Strachan and Read, 1999）。目前，生物素-链霉亲和素和地高辛标记法是两种最常用的非同位素间接标记方法。[如图1-11](#_bookmark33)a所示，地高辛和生物素基团通常会通过一个含有11或16个碳原子的空间臂（digoxigenin-11-UTP或biotin-16-dUTP）与尿嘧啶核苷酸上的C5位置相连。生物素-链霉亲和素系统通常利用两种具有极高亲和性的配体，一种是生物素（一种天然的水溶性维生素，在该系统中作为报告基因）；另一种是链霉亲和素。地高辛是一种从洋地黄类植物中提取的类固醇物质，由于洋地黄植物的花和叶片是地高辛在自然界中的唯一来源，因此抗地高辛的抗体不会与其他生物物质结合，从而可以满足特异性标记的需要，地高辛特性性抗体只能检测到含有地高辛报告基因的核酸分子。[图1-11](#_bookmark33)b展示了地高辛探针标记和杂交的过程。



图1-11 （a）地高辛（DIG）或生物素标记的核苷酸结构（Strachan and Read, 1999）

（b）地高辛探针的标记和杂交检测程序

Fig. 1-11 (a) Structures of digoxigenin- and biotin-modified nucleotides (Strachan and Read, 1999)

(B) Labeling and detection procedure of the hybridization using digoxigenin-labeled probes

自二十世纪八十年代以来，斑点杂交已经取代PAGE成为PSTVd及其他类病毒检测中的常规技术（Owens and Diener, 1981），同位素和非同位素探针标记体系不断地应用于类病毒检测

(Lakshman et al., 1986; Candresse et al., 1990; Nakahara et al., 1998)。Northern杂交、组织印记杂交、

斑点杂交已经成为类病毒分子生物学检测方法中的常规技术，Northern杂交和斑点杂交需要水溶性的RNA/DNA提取物，而组织印记杂交仅需要将新鲜样品的汁液直接印到杂交膜上即可，但是结果有时候不可靠（Lakshman et al., 1986）。

近年来，非同位素分子杂交技术已经被用于多种植物类病毒的同时检测，这种方法需要可以同时检测多种类病毒的多聚探针或多种单一探针的混合物，与传统的单探针杂交方法相比，此法成本较低，省时省力，快速高效，可操作性强，已经成为广泛应用的常规诊断方法之一（Herranz et al., 2005; Cohen et al., 2006; Aparicio et al., 2008; Lin et al., 2011; Zhang et al., 2012）。

**1.7****锦紫苏类病毒研究现状**

锦紫苏是一种草本观赏植物，起源于印度尼西亚，它可以被马铃薯纺锤块茎类病毒科锦紫苏类病毒属的类病毒侵染，目前为止，共发现了六种锦紫苏类病毒，分别命名为锦紫苏类病毒-1～锦紫苏类病毒-6（CbVd-1～CbVd-6），[如表1-2](#_bookmark35)所示，其大小介于250 bp～364 bp之间（Fonseca et al., 1989; Spieker et al., 1996; Spieker, 1996b; Hou et al., 2009a, 2009b）。作为马铃薯纺锤块茎类病毒科的成员，所有的锦紫苏类病毒具有共同的中央保守区（CCR）。CCR 是已知马铃薯纺锤块茎类病毒科的类病毒复制过程中剪切和连接等步骤的重要结构原件（Diener, 1986; Steger and Riesner, 2003; Gas et al., 2007），同时，CCR似乎对类病毒复制过程中二级结构的形成和稳定也起着重要作用（Sano et al., 1992; Spieker, 1996b; Sano and Ishiguro, 1998）。1981年，Fonseca等人从巴西的市售黄色锦紫苏中发现了CbVd-1（Fonseca et al., 1989），这是第一个发现的锦紫苏类病毒，紧接着，1990年，Spieker等人首次报道了CbVd-1的全序列（Spieker et al., 1990）。随后，世界上很多国家

包括德国、加拿大、日本、中国、韩国、印度等陆续对CbVd-1在该国的首次发现进行了报道（Spieker et al., 1990; Singh and Boucher, 1991; Ishiguro et al., 1996, Li et al., 2006; Chung and Choi, 2008; Adkar-Purushothama et al., 2013）。研究表明：CbVd-1可以通过种子进行传播，在品种为‗Ruhm von

Luxemburg‘的锦紫苏上，CbVd-1的种传率甚至可以高达100%（Spieker, 1996a）。在加拿大，根据品种和来源的不同，市售锦紫苏种子中CbVd-1的侵染率为16%～68%，以上结果均可证明CbVd-1可以通过种子进行传播（Singh and Boucher, 1991）。此外，CbVd-1在不同品种的锦紫苏上可引起矮化、斑驳等不同的症状，在某些品种的锦紫苏上也可能呈潜伏侵染（Fonseca et al., 1989; Singh and Boucher, 1991; Spieker, 1996a; Chung and Choi, 2008）。1996年，德国科学家首次报道了CbVd-2，它是第一个被发现的自然界中存在的类病毒重组体，除了德国之外，中国最近也报道了此类病毒

（Fu et al., 2011）。1991年，德国科学家首次报道了CbVd-3(Spieker, 1991)，2011年，中国也报道了此类病毒（Jiang et al., 2011a），目前世界上只有德国和中国报道了CbVd-2和CbVd-3. CbVd-4是1996年德国科学家人工构建的已被证明具有生物学活性的嵌合体。CbVd-5和CbVd-6是中国

科学家报道的两个类病毒新种（Hou et al., 2009a, 2009b），自2009年首次报道以来，印度和印度尼西亚的锦紫苏样品中也发现了CbVd-5（Jiang et al., 2012），最近，日本的锦紫苏样品中也发现了CbVd-6（未发表）。目前为止，还没有关于CbVd-5和CbVd-6生物学活性方面的报道。

[如图1-12](#_bookmark36)所示，所有的锦紫苏类病毒拥有共同的CCR，而且其分子间具有高效重组的特性，根据其二级结构，CbVd-2的左半部分和右半部分分别与CbVd-3和CbVd-1相同，而CbVd-4与CbVd-2刚好相反，左半部分和右半部分分别来自CbVd-1和CbVd-3（Spieker, 1996b）。有意思的是，CbVd-6的左半部分和右半部分分别与CbVd-3和CbVd-5相同（Hou et al., 2009b），由此可见，CbVd-3是迄今为止在重组方面最为活跃的锦紫苏类病毒，对其进行深入研究将有利于CbVd重组机理的阐明。

具有侵染性的类病毒cDNA已经广泛应用于类病毒的生物学活性实验，此技术已经成功应用于CbVd-1和CbVd-3. Fonseca和Spieker等人利用cDNA克隆或RNA体外转录产物通过柯赫氏法则验证了CbVd-1和CbVd-3的生物学活性，为这两个类病毒新种分类地位的确立提供了生物学证据（Owens and Hammond, 1987; Fonseca et al., 1994; Spieker, 1996a; Spieker et al., 1996），然而，迄今为止，CbVd-5和CbVd-6的生物学活性还没有明确的实验结果予以证实，因此它们还没有作为正式的新种被国际病毒分类委员会（ICTV）认可。

表1-2 CbVd-1～CbVd-6的大小及两两之间的序列相似性（%）

Table 1-2 Size of CbVd-1～CbVd-6 and similarities among different CbVds (%)

| 大小 (bp) | 250 | 301 | 364 | 295 | 274 | 342 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CbVds | CbVd-1 | CbVd-2 | CbVd-3 | CbVd-4 | CbVd-5 | CbVd-6 |
| CbVd-1 | 100% | 57.95% | 34.32% | 56.39% | 50.35% | 38.3% |
| CbVd-2 | - | 100% | 64.11% | 41.25% | 52.13% | 72.51% |
| CbVd-3 | - | - | 100% | 61.58% | 38.19% | 70.68% |
| CbVd-4 | - | - | - | 100% | 59.12% | 39.89% |
| CbVd-5 | - | - | - | - | 100% | 59.88% |
| CbVd-6 | - | - | - | - | - | 100% |

前言



图1-12 锦紫苏类病毒-1～6的二级结构示意图

Fig. 1-12 Schematic for the proposed secondary structures of*Coleus blumei viroid*-1～6

虚线表示各个类病毒之间序列相同的部分，黑色实线内的核苷酸碱基代表CbVds共同的中央保守区序列，绿色和蓝色部分表示的是左末端和右末端保守区（TCR和RCR）的序列。CbVd-2和CbVd-6是自然状态下存在的类病毒重组体，CbVd-4是人工构建的类病毒嵌合体。根据CbVds的二级结构，CbVd-2的左半部分和右半部分分别与CbVd-3和CbVd-1相同，而CbVd-4与CbVd-2刚好相反，左半部分和右半部分分别来自CbVd-1和CbVd-3；CbVd-6的左半部分和右半部分分别与CbVd-3和CbVd-5相同。

20

## **1.8** 本研究的目的及意义

作为最简单的生命形式，类病毒是研究生命起源的绝佳材料。类病毒基因多样性的研究对类病毒进化和传播机制的阐明具有重要意义。由于类病毒的基因是以准种模式存在的，对每个类病毒个体基因序列和突变范围的分析有利于深入了解类病毒在不同寄主体内的进化过程。重组现象在锦紫苏类病毒中非常普遍，对CbVds的深入研究也将大大有助于重组机制的阐明。虽然目前已经报道了很多种类病毒，但是其起源、致病机制、复制机理等都还是未知，需要进一步的研究，类病毒检测技术的不断进步和快速检测方法的建立也将有助于类病毒新种的发现和类病毒的疫情普查。

本研究的目的之一是建立锦紫苏类病毒的快速检测方法，结果表明：本文建立了锦紫苏类病毒的两种快速检测方法，分别是Sap-direct RT-PCR法和通用探针快速杂交法（地高辛标记），这两种方法都能同时检测多种锦紫苏类病毒；本研究的另一个目的是对自然界中和接种植株中存在的锦紫苏类病毒进行克隆测序，分析自然状态下CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的种群多样性和接种后其子代序列的分子特性及突变热点；此外，本研究还构建了以上四种类病毒的二倍体侵染性克隆，接种锦紫苏后分析了类病毒子代序列变异与寄主品种之间的关系。

本研究中得到了许多锦紫苏类病毒序列，不仅丰富了Genbank中的类病毒序列信息，对研究类病毒的起源、进化、复制和致病机理也有重要意义，同时，本研究还为CbVds的检验检疫提供了理论依据。

# **2** 材料和方法

## **2.1** 材料

### **2.1.1** 载体和菌种

pMD18-T载体([图2-1](#_bookmark41))、pGEM-T载体（[图2-2](#_bookmark42)）和*E. coli* DH5α感受态细胞分别购自宝生物工程有限公司（Takara Corporation, Japan）、普洛麦格生物技术有限公司（Promega Corporation, America）和天根生化科技有限公司（Tiangen Biotech Corporation, China）。



图2-1 pMD18-T载体



Fig. 2-1 pMD18-T Vector

图2-2 pGEM-T载体

Fig. 2-2 pGEM-T Vector

### **2.1.2** 仪器

移液器、5804R台式低温离心机、5424台式低温离心机（Eppendorf, Germany）；FRESCO

21台式高速冷冻离心机（Thermo, America）；真空冷冻干燥仪（America）；My Cycler Thermal Cycler PCR仪（BIO-RAD, America）；落地式高速冷冻离心机（America）；紫外凝胶成像系统（America）；恒温水浴锅、干式恒温器（China）；TP200S微量电子天平（America）；TL2010微量组织研磨仪（China）；DYY-6B小型稳压电泳仪和电泳槽（China）；超净工作台（China）；

-80℃超低温冰箱（China）；台式多功能摇床（China）；CL-1000紫外交联仪（America）；分子杂交炉、杂交瓶（America）；微量紫外分光光度计NanoDrop®ND-1000 UV–Vis Spectrophotometer (NanoDrop, America)。

### **2.1.3** 试剂

限制性内切核酸酶、修饰酶、RNA酶抑制剂、dNTPs混合液、DNA marker、碱性磷酸酶（CIAP）均购自宝生物工程有限公司（Takara Corporation, Japan）；M-MLV反转录酶、T7/SP6 RNA聚合酶、酵母膏、胰蛋白胨均购自普洛麦格生物技术有限公司（Promega Corporation, America）；地高辛标记试剂盒、杂交液、AP抗体以及CSPD发光底物均购自罗氏公司（Roche, Switzerland），杂交膜购自安玛西亚公司（Hybond-N+, Amersham Biosciences, America）；KOD-Plus-Neo聚合酶购自东洋纺生物公司（Toyobo corporation, Japan）；2×Taq PCR Master Mix购自天根生化科技有限公司（Tiangen Biotech Corporation, China）；PCR/DNA纯化试剂盒购自AxyPrep公司（America）；DNA绿如蓝染料均购自北京江晨宏伟生物科技有限责任公司（China）；常用生化试剂均为市售；引物合成和测序由北京华大基因研究院完成（Huada gene, China）。

## **2.2** 方法

### **2.2.1** 类病毒提取方法（**LiCl**法和**Sap-direct**法）

#### 2.2.1.1 LiCl 法

本研究中锦紫苏类病毒低分子量RNA的大量抽提均采用LiCl法（Li et al., 1995），RNA提取物的质量通过微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶（1.5%）电泳进行分析，具体步骤如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 取 1 g 植物组织样品放于研钵中，加入液氮冷冻后充分研碎再转入离心管，然后加入 2  倍体积重量比的 K2HPO4（1 M）和适量巯基乙醇（约 8 μl)，再加入 2 倍体积重量比的水饱和酚/氯仿（1/1）充分混匀，用水饱和酚/氯仿配平后 10000 rpm 离心 10 min。 |

|  |  |
| --- | --- |
| 2. | 取上层液体，加入同体积的水饱和酚/氯仿（1/1）充分混匀，用水饱和酚/氯仿配平后  10000 rpm 离心 10 min。 |
| 3. | 取上层液体，加入 2.5 倍体积的无水乙醇，充分混匀，-20℃存放至少 2 h 后用无水乙醇  配平，10000 rpm 离心 10 min。 |
| 4. | 取固体沉淀，加入 1 ml 的 DDW 充分溶解后，加入等体积的 K2HPO4（2.5 M）和等体  积的乙二醇单甲醚，充分混匀，用乙二醇单甲醚配平后 10000 rpm 离心 10 min。 |
| 5. | 取上层液体，加入 DDW 至 10 ml 再加入 1/100 体积的 CTAB（2%），摇匀后放入冰中  存放 3～4 h，用重蒸水（ddH2O）配平后 10000 rpm 离心 10 min。 |
| 6. | 取沉淀，加入 1 ml 的 DDW 充分溶解后，再加入 2.5 倍体积的无水乙醇、1/10 体积的醋  酸钠（3 M），摇匀后-20 ℃存放至少 2 h，无水乙醇配平后 10000 rpm 离心 10 min。 |
| 7. | 取沉淀，400 μl ddH2O 溶解后加入 400 μl LiCl（4M），混匀后置于冰上至少 4 h, 10000  rpm 离心 10 min。 |
| 8. | 取上层液体，吸至 1.5 ml 离心管，加入 2.5 倍体积的无水乙醇，-20 ℃存放至少 2 h，  10000 rpm 离心 10 min。 |
| 9. | 取沉淀，然后用 70%的乙醇洗沉淀，干燥后溶于 20～30 μl TE 缓冲液或 ddH2O 中。 |

#### 2.2.1.2 Sap-direct 法

用移液器（量程：0.5～10µl）插上吸头后直接从锦紫苏植物的茎部和叶片中吸取锦紫苏的汁液放入洁净的1.5 ml离心管中后封闭，以避免交叉污染。从叶片中吸取汁液时，需要先将叶片夹入两层塑料纸中压出汁液后再用移液器吸取。吸取的汁液直接作为反转录反应液中的模板，简单方便。

### **2.2.2** 反转录**-**聚合酶链式反应（**RT-PCR**）

#### 2.2.2.1 引物设计

##### 2.2.2.1.1 CbVds通用引物的设计

所有的锦紫苏类病毒拥有共同的CCR[（图2-3](#_bookmark50)a），根据CCR序列设计了能扩增所有锦紫苏类病毒的通用引物：CbVds-P1和CbVds-P2（[表2-1](#_bookmark48)）。

表2-1 CbVds通用引物

Table 2-1 Primers for coleus viroids

| 名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| CbVds-P1 (F) | 5‘- GCA GCG CTG CAA CGG AAT -3‘ |
| CbVds-P2 (R) | 5‘- GCA GCG CTG CCA GGG AAC CCA GGT -3‘ |

##### 2.2.2.1.2 CbVds特异引物的设计

本研究根据CbVds的序列特征，分别设计了CbVd-1～CbVd-6[的特异引物（表2-2](#_bookmark49)）。表2-2 CbVds特异引物（扩增片段大小见表1-2）

Table 2-2 Specific primers for coleus viroids

| 名称 | 引物序列 | 扩增片段大小 |
| --- | --- | --- |
| CbVds-1F | 5'- GCA GCG CTG CAA CGG AAT -3‘ | 250 bp |
| CbVds-1R | 5'- CAG GGA ACC CAG GTA AGC -3‘ |  |
| CbVds-2F | 5'- CGG ATC ATT TTC TTG TGG -3‘ | 301 bp |
| CbVds-2R | 5'- AGG ATC GCT TTT CGC GGT -3‘ |  |
| CbVds-3F | 5'- CGG ATC ATT TTC TTG TGG -3‘ | 364 bp |
| CbVds-3R | 5'- AGG ATC GCT TTT CGC GGT -3‘ |  |
| CbVds-4F | 5'- TGG CTC GAA CTG ACT AG -3‘ | 295 bp |
| CbVds-4R | 5'- AGC TCG TTT AAG CTG AAC -3‘ |  |
| CbVds-5F | 5'- TGA CCT CAA TTG ACT AG -3‘ | 274 bp |
| CbVds-5R | 5'- AAC CTC TTT AAG TTG AAC -3‘ |  |
| CbVds-6F | 5'- GAA TTC AGG GCA CGG AGT -3‘ | 342 bp |
| CbVds-6R | 5'- CGT TGC AGC GCT GCC AGG -3‘ |  |
| T7 启动子序列 | 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3‘ |  |

#### 2.2.2.2 RT-PCR反应体系和反应条件

##### 2.2.2.2.1 反转录（RT）

RNA抽提液稀释到适当的浓度后，吸取1µl加入到以下反应体系中进行反转录：反转录体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 模板 | 1 μl |
| dNTPs | 1 μl |
| M-MLV 反转录酶 | 1 μl |
| RNA 酶抑制剂 | 0.25 μl |
| 5×M -MLV 缓冲液 | 2 μl |
| 反向引物 (10 pmol) | 1 μl |
| ddH2O | 3.75 μl |
| 合计 | 10 μl |

以上反应混合液于25 ℃放置10 min后，42 ℃孵育1 h，然后98 ℃变性5 min，最后

置于冰上冷却至少2 min。

福建农林大学2013届博士毕业论文



图2-3 CbVds通用引物和通用探针构建示意图

Fig. 2-3 Construction of universal primers and probes for CbVds

（a）锦紫苏类病毒-1～6二级结构示意图；（b）用于设计锦紫苏类病毒通用引物的序列位置：CCR上游区域的核苷酸序列；（c）锦紫苏类病毒通用探针（8CCR探针）设计示意图：CCR上游的32个碱基重复8倍后作为通用探针制备的模板，通过体外转录制备能够杂交检测所有锦紫苏类病毒的通用探针，红色箭头表示T7启动子的序列，用来启动体外转录反应。

27

##### 2.2.2.2.2 PCR

反转录完成后，将1µl反转录产物加入到PCR反应体系中。

PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 反转录产物 | 1 μl |
| KOD-Plus-Neo 聚合酶 | 0.4 μl |
| dNTPs | 2 μl |
| MgSO4 | 1 μl |
| 10 × PCR 缓冲液 | 2 μl |
| Former primer (20 pmol/L) | 0.2 μl |
| Reverse primer (20 pmol/L) | 0.2 μl |
| ddH2O | 13.2 μl |
| 合计 | 20 μl |

PCR反应液轻轻混匀后，按照以下反应条件进行反应：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 94 ℃ | 5 min |  |
| 94 ℃ | 30 sec |  |
| Tm | 30 sec | 25 个循环 |
| 72 ℃ | 30 sec |  |
| 72 ℃ | 10 min |  |

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后用绿如蓝染料（1 pg/ml）进行染色，紫外凝胶成像系统下利用D2000 Marker对目的条带大小进行估测。

### **2.2.3** **PCR**产物的纯化

琼脂糖凝胶电泳后，使用AxyPrep DNA凝胶纯化试剂盒对PCR产物进行纯化。

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 在紫外灯下用洁净的刀片切下含有目的 DNA 条带的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面  液体并切碎。计算凝胶重量，该重量作为一个凝胶体积（如 100 mg = 100 μl 体积）。 |
| 2. | 加入 3 倍凝胶体积的 Buffer DE-A。 |
| 3. | 混合均匀后于 75 ℃加热，间断混合（每 2～3 min 摇匀一次），直至凝胶块完全熔化。 |
| 4. | 加 0.5 倍 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B，混合均匀；当分离的 DNA 片段小于 400 bp  时，加入 1 倍凝胶体积的异丙醇。 |
| 5. | 吸取 3 中的混合液，转移到 2 ml 离心管（制备管）中，12，000×g 离心 1 min。 |

|  |  |
| --- | --- |
| 6. | 弃滤液，将制备管放回离心管，加 0.5 ml Buffer W1，12，000×g 离心 30 s。 |
| 7. | 弃滤液，将制备管放回离心管，加 0.7 ml Buffer W2，12，000×g 离心 30 s。 |
| 8. | 弃滤液，以同样的方法再用 0.7 ml Buffer W2 洗涤一次，12，000×g 离心 1 min。 |
| 9. | 将制备管置于 2 ml 离心管中，12，000×g 离心 1 min。 |
| 10. | 将制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管中，在 DNA 制备膜正中央加 25～30 μl ddH2O 或  Eluent，室温静置 1 min，12，000×g 离心 1 min，洗脱 DNA。 |

### **2.2.4** 连接

PCR纯化产物直接与pMD18-T或pGEM-T载体相连，然后将连接产物转入*Escherichia coli* DH5α感受态细胞进行培养。

连接体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 载体 | 0.5 μl |
| PCR 产物 | 2 μl |
| 2×连接缓冲液 | 2.5 μl |
| 合计 | 5 μl |

混匀后短暂离心，16℃连接1 h。如果连接产物用于制备RNA探针，PCR纯化产物需要连入到带有T7/SP6启动子的pGEM-T载体的多克隆位点上。

### **2.2.5** **D**H5α感受态细胞的制备

DH5α感受态细胞的制备需要在低温和无菌的条件下进行操作。

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 室温下融化甘油中保存的 *E.coli* DH5α 菌。 |
| 2. | 无抗性 LB 平板上划线，37 ℃培养后分离得到单菌落。 |
| 3. | 将大肠杆菌单菌落接种于 3 ml LB 液体培养基，37 ℃振荡培养过夜。 |
| 4. | 按 1: 100 的比例将过夜的菌液接种于 100 ml LB 液体培养基，37 ℃振荡培养约 1.5～2  h，直到菌液的 OD600 值达到 0.5～1.0. |
| 5. | 菌液倒入 2 个无菌洁净的 50 ml 离心管中，置于冰上 10 min。 |
| 6. | 12000 rpm, 4 ℃离心 10 min。 |
| 7. | 弃上清，加入 25 ml CaCl2（0.1 M，灭菌，4 ℃预冷），悬浮沉淀后置于冰上 15 min。 |
| 8. | 12000 rpm, 4 ℃离心 10 min。 |
| 9. | 弃上清，菌体用 3 ml 含有 16～20%甘油的 CaCl2（0.1 M，灭菌，4 ℃预冷）轻轻悬浮，  置于冰上 10 min。 |

|  |  |
| --- | --- |
| 10. | 将感受态细胞分装到 1.5 ml 离心管（100 μl/管）后，置于-70℃长期保存。 |

### **2.2.6** 转化

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 冰上融化一管 DH5α 感受态细胞。 |
| 2. | 取连接产物 5 μl 加入到感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 30 min。 |
| 3. | 42 ℃热击 90 s，立即冰浴 2 min。 |
| 4. | 加无抗性的 900 μl LB 液体培养基，混匀，37 ℃培养 1 h。 |
| 5. | 涂布 100 μl 菌液于 LB 平板（含 Amp 抗性）上。 |
| 6. | 平板倒置在 37℃恒温箱中培养过夜。 |

### **2.2.7** 阳性克隆的筛选

#### 2.2.7.1 菌液PCR

菌液PCR是利用菌落/菌液作为PCR模板直接进行PCR的一种快速筛选阳性克隆的方法。用接种环或移液器吸头直接挑取目的菌落/吸取目的菌液加入到PCR反应体系中，利用载体上的通用引物（pMD18-T和pGEM-T载体上的通用引物是M13-47和RV-M[，表2-3](#_bookmark56)）进行PCR. PCR反应体系和反应条件参考2.2.2.2.2.

表2-3 菌液PCR通用引物

Table 2-3 Universal primers for colony PCR

| 名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| M13-47 | 5‘- GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3‘ |
| RV-M | 5‘- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3‘ |

### **2.2.8** 序列分析

将筛选得到的阳性克隆送至华大基因研究院（Huada gene）进行测序，测序结果利用DNAMAN（Version 6.0）和Clustal W（Version 1.83）生物学软件进行序列分析，利用CLC RNA Workbench package（version 3.0.1, [http: //www. clcrnaworkbench. com/](http://www.clcrnaworkbench.com/)）分析所得序列的二级结构，利用Molecular Evolutionary Genetics Analysis [MEGA]软件（version 4.0,

[http: //www. megasoftware. net](http://www.megasoftware.net/)）中的Neighbor-Joining（NJ）和Maximum-Parsimony（MP）方法对所得序列进行进化分析。

### **2.2.9** 地高辛标记**RNA**探针的制备

RNA提取物经甲醛变性后，点到杂交膜上，随后，利用地高辛标记的CbVd-1～CbVd-6

特异性RNA探针或者CbVds通用探针按照地高辛标记和检测试剂盒进行杂交。

锦紫苏类病毒属的类病毒具有共同的CCR，将CCR上游的32个碱基扩增八倍，八倍体序列由金唯智生物科技有限公司合成后连接到pUC 57载体上（Genewiz, China），然后作

为模板制备能够同时检测所有锦紫苏类病毒的通用地高辛-cRNA探针，称为8CCR探针（[图2-3](#_bookmark50)c）。CbVds特异探针和通用探针被限制性内切酶线性化之后利用T7启动子按照地高辛标记试剂盒说明书通过体外转录完成制备。

#### 2.2.9.1 质粒提取

按照Qiagen质粒小提试剂盒使用说明，使用低温离心机提取质粒。

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 挑取单菌落至于 5 ml LB 培养基（Amp 抗性）中，37 ℃培养 16 h，离心集菌后用 250 ul  缓冲液 P1 重新悬浮细胞。 |
| 2. | 加入 250 ul 缓冲液 P2，轻微颠倒 6～8 次使之完全混匀。 |
| 3. | 加入 350 ul 缓冲液 N3，并反复颠 6～8 次使之完全混匀。 |
| 4. | 13000 rpm 室温离心 10 min。 |
| 5. | 取上清，用移液器转入到 2 ml 离心管（制备管）的离心柱中。 |
| 6. | 13000 rpm 室温离心 60 s，弃滤液。 |
| 7. | 加入 0.5 ml 缓冲液 PB, 13000 rpm 室温离心 60 s，弃滤液。 |
| 8. | 加入 0.75 ml 缓冲液 PE, 13000 rpm 室温离心 30～60 s，弃滤液。 |
| 9. | 再次空管 13000 rpm 室温离心 1 min 以完全除去残留缓冲液，弃滤液。 |
| 10. | 将离心柱置于一个新的离心管中，加入 50 ul TE 缓冲液或 ddH2O，室温静置 1 min, 13000  rpm 室温离心 1 min，洗脱 DNA。 |

#### 2.2.9.2 酶切反应

用于标记RNA探针的重组质粒需线性化后使用。

10×OPA 缓冲液：

|  |  |
| --- | --- |
| Tris·H Cl | 0.1 mol/L |
| KCH3COOH | 0.5 mol/L |
| Mg(CH3COOH)2 | 0.1 mol/L |

酶切反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 重组质粒 | 2 µg |
| 10×OPA 缓冲液 | 5 µl |
| 限制性内切酶 | 2.5 µl |
| ddH2O | -- µl |
| 合计 | 50 µl |

#### 2.2.9.3 酶切产物的纯化

酶切产物按照Qiagen-DNA纯化试剂盒使用说明进行操作。

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 向酶切产物中加入 5 倍体积的 PB 缓冲液，混合均匀。检查混合液颜色是否变黄色（类  似 PB 缓冲液的颜色），如果混合液呈橘色或者紫色，继续加 10 μl 醋酸钠（3 M, pH 5.0） 并混合均匀，这时，混合液颜色将变为黄色。 |
| 2. | 将 Qiagen 离心柱放置在 2 ml 收集管中。 |
| 3. | 将混合液吸入离心柱中，13000 rpm 室温离心 1 min 以结合 DNA。 |
| 4. | 弃滤液，将 Qiagen 离心柱放回收集管中。 |
| 5. | 加入 750 μl 缓冲液 PE, 13000 rpm 室温离心 1 min，洗涤离心柱。 |
| 6. | 弃滤液，将 Qiagen 离心柱放回收集管中。 |
| 7. | 再次空管 13000 rpm 室温离心 1 min 以完全除去残留缓冲液，弃滤液。 |
| 8. | 将离心柱置于一个新的离心管中。 |
| 9. | 加入 25 ul EB 缓冲液（10 mM Tris·HCl, pH 8.5 ）或 ddH2O，室温静置 1 min, 13000 rpm  室温离心 1 min 洗脱 DNA。 |

#### 2.2.9.4 RNA探针标记

RNA标记反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 模板 | 1 μg |
| 10×DTT | 2 μl |
| 5× 转录缓冲液 | 4 μl |
| RNA 酶抑制剂 | 1 μl |
| T7/SP6 RNA 聚合酶 | 2 μl |
| 10× NTP 标记混合液 | 2 μl |
| ddH2O | -- |
| 合计 | 20 μl |

探针标记使用2.2.9.3中纯化好的线性化DNA为模板，利用T7/SP6 RNA聚合酶通过体外转录完成。以上反应混合液混匀离心后37℃温浴2 h，反应结束后，加入2μl EDTA（0.2 M, pH 8.0）终止反应，取1μl标记产物通过1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，检测合格后的探针放于-20 ℃长期保存。

### **2.2.10** 斑点杂交

预杂交和杂交步骤均按照Roche公司地高辛探针标记及检测试剂盒说明书进行操作。

#### 2.2.10.1 试剂配制

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. | 10×TE buffer | 100 ml |
|  | EDTA | 0.372 g |
|  | Tris-Base | 1.211 g |
|  | pH 值调至 8.0 |  |
| 2. | 20×SSC | 100 ml |
|  | NaCl | 17.53 g |
|  | Sodium citrate | 8.82 g |
|  | pH 值调至 7.0 |  |
| 3. | 2×SSC 0.1% SDS | 100 ml |
|  | SDS | 0.1 g |
|  | 20×SSC | 10 ml |
| 4. | 0.5×SSC 0.1% SDS | 100 ml |
|  | SDS | 0.1 g |
|  | 20×SSC | 2.5 ml |
| 5. | Maleic acid buffer | 100 ml |
|  | NaCl | 0.8775 g |
|  | Maleic | 1.16 g |
|  | pH 值调至 7.5 |  |
| 6. | Washing buffer | 100 ml |
|  | Tween 20 | 0.3 ml |
|  | Maleic acid buffer | 99.7 ml |
| 7. | Detection buffer | 100 ml |
|  | NaCl | 0.585 g |
|  | Tris-Base | 1.211 g |
|  | pH 值调至 9.5 |  |
| 8. | Blocking solution | 100 ml |
|  | Blocking reagent | 1 g |
|  | Maleic acid buffer 定容到 100 ml（现用现配） | |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 9. | Antibody solution | 100 ml |
|  | Anti- digoxigenin-Ap | 10 μl |
|  | Blocking solution 定容到 100 ml（现用现配） | |

#### 2.2.10.2 杂交步骤

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 样品处理：取 1 μl 的 RNA 样品，加 3 倍体积的变性液（甲酰胺 500 μl，甲醛 162 μl，  10×MOPS 100 μl），混匀后于 65 ℃保温 15 min，置于冰上 2 min 后再加入等体积的  20×SSC ，得到处理的 RNA 原液。 |
| 2. | 点膜：用适当的移液器吸取变性处理过的原液 2.5 μl 点于杂交膜上。 |
| 3. | 固定：杂交膜室温干燥后，80 ℃烘烤 1～2 h 或紫外交联（1,200×100 J/cm2）3 min。 |
| 4. | 预杂交：将膜装入杂交瓶后，加入适量的预热杂交液（约 10～15 ml/100 cm2），用玻璃  棒赶出所有气泡后放于杂交炉中，68 ℃预杂交至少 30 min。 |
| 5. | 杂交：将地高辛标记的 RNA 探针 100 ℃煮沸 6～8 min 使之变性，然后迅速在冰中冷却 5～10 min，加入预热的杂交液中后快速替换预杂交液，杂交炉中 68 ℃过夜（至少  6 h)。 |
| 6. | 第一次洗涤：在室温下用 2×SSC 、0.1%SDS 洗涤 2×5 min 。 |
| 7. | 第二次洗涤：68 ℃条件下，用 0.1×SSC , 0.1%SDS 严格洗涤 2×15 min。 |
| 8. | 第三次洗涤：在室温下用 Washing buffer 洗涤 5 min。 |
| 9. | 封闭：在室温下用 Blocking solution 孵育 30 min。 |
| 10. | 抗体反应：在 37 ℃用 Antibody solution 孵育 30 min。 |
| 11. | 洗涤：在室温下用 Washing buffer 洗涤 2×15 min。 |
| 12. | 平衡：在室温下用 Detection buffer 平衡 2～5 min。 |
| 13. | 发光：杂交膜封入杂交袋后，将 CSPD 颠倒摇匀，每毫升检测液中滴入 6～8 滴 CSPD  摇匀后用移液器加到杂交膜上并使其在膜上扩散均匀，室温放置 10 min，将多余的  CSPD 液体挤净后封口，37 ℃孵育 10 min。 |
| 14 | 曝光：在暗室中取出 X 光片，放在杂交膜上曝光 3 h 以上，然后取出胶片进行显影，定  影，最后将定影好的 X 光片室温晾干后拍照。 |

### **2.2.11** 聚丙烯酰胺凝胶电泳（**PAGE**）

#### 2.2.11.1 凝胶制备

5%非变性胶：

|  |  |
| --- | --- |
| 30%丙烯酰胺（Arc : Bis, 29 : 1）  5×TBE TEMED 10%APS  ddH2O | 5 ml  6 ml  20 μl  210 μl  -- ml |
| 合计 | 30 ml |

5%变性胶：

|  |  |
| --- | --- |
| 30% 丙烯酰胺（Arc : Bis, 29 : 1）  5×TBE TEMED 10%APS  尿素  ddH2O | 5 ml  6 ml  10 μl  210 μl  14.41 g  --ml |
| 合计 | 30 ml |

#### 2.2.11.2 二维电泳（2D-PAGE）

参考Schumacher等的方法进行操作（Schumacher et al., 1983）。

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 清洁胶板：首先用 ddH2O 清洗胶板后再用 95%擦拭干净。 |
| 2. | 灌胶：将胶板和胶条固定后斜放，小心倒入非变性胶后插上梳子，尽量避免产生气泡。  室温放置 30～60 min，待胶凝后进行电泳。 |
| 3. | 电泳槽中注入 1×TBE 缓冲液，小心拔出梳子和胶条，将胶板固定在电泳槽中。 |
| 4. | 用移液器吸头或注射器针头吹去胶孔中的杂质和气泡。 |
| 5. | 上样：将 RNA 提取物与 6×上样缓冲液混匀后，用移液器将样品注入胶孔的底部。 |
| 6. | 连接好电极后，将电压调至 200 V 开始电泳，直到二甲苯青到达距底部 1/4 的位置。 |
| 7. | 关掉电源，将类病毒迁移条带沿泳道纵向切下，将其旋转 90℃，平放于一个新胶板的  底部。 |
| 8. | 将胶板和胶条固定后斜放，小心倒入含 8M 尿素的变性胶后插上梳子，尽量避免产生气  泡。室温放置 30～60 min，待胶凝固后进行电泳。 |
| 9. | 电泳槽中注入 1×TBE 缓冲液，小心拔出梳子和胶条，将胶板固定在电泳槽中。 |

|  |  |
| --- | --- |
| 10. | 连接好电极后（正负极互换），将电压调至 600 V 开始电泳。 |
| 11. | 当二甲苯青到达凝胶顶部时，停止电泳。 |
| 12. | 去除胶板，银染色后查看电泳结果。 |

#### 2.2.11.3 Northern杂交

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 清洁胶板：首先用水清洗胶板后再用 95%擦拭干净。 |
| 2. | 灌胶：将胶板和胶条固定后斜放，小心倒入非变性胶后插上梳子，尽量避免产生气泡，  室温放置 30～60 min，待胶凝后进行电泳。 |
| 3. | 电泳槽中注入 1×TBE 缓冲液，小心拔出梳子和胶条，将胶板固定在电泳槽中。 |
| 4. | 用移液器吸头或注射器针头吹去胶孔中的杂质和气泡。 |
| 5. | 上样：将 RNA 提取物与 6×上样缓冲液混匀后，用移液器将样品注入胶孔的底部。 |
| 6. | 连接好电极后，将电压调至 600 V 开始电泳，直到二甲苯青到达凝胶底部。 |
| 7. | 去除胶板，银染色后查看电泳结果。 |

#### 2.2.11.4 银染色

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | 固定：将凝胶浸泡在 150 ml 固定液（10%乙醇，0.5%冰醋酸）中，水平摇床上摇晃 15  min 后弃固定液。 |
| 2. | 染色：将凝胶浸泡在 150 ml 染色液（12 mmol/L AgNO3）中，水平摇床上摇晃 15 min，  弃染色液。 |
| 3. | 蒸馏水洗胶 2 次，每次约 30 s。 |
| 4. | 显色：将凝胶浸泡在显色液（400 mmol/L NaOH, 0.4%甲醛）中，显色至条带清晰为止，  弃显色液。 |
| 5. | 终止：将凝胶浸泡在终止液（70 mmol/L Na2CO3）中，终止显色，然后扫描/照相。 |

#### 2.2.11.5 转膜

聚丙烯酰胺凝胶电泳完毕，掀开一侧胶板，剪取凝胶大小的杂交膜，平铺于凝胶上面，膜上铺滤纸后再压上胶板，室温过夜即可。.

# **3** 锦紫苏类病毒的两种快速检测方法

Sap-direct RT-PCR法和通用探针快速杂交法

## **3.1** **Sap-direct RT-PCR** 法

### **3.1.1** 前言

迄今为止，很多国家已经报道了CbVd-1，然而，其他5种锦紫苏类病毒（CbVd-2～CbVd-6）的相关报道还比较少，快速检测方法的建立将有助于调查锦紫苏类病毒的发生分布情况。

目前已经报道了很多检测类病毒的方法，包括：利用地高辛标记的探针进行的杂交方法、2D-PAGE、Return-PAGE等（Schumacher et al., 1983; Schumacher et al., 1986; Welnicki and Hiruki, 1992），但是，这些方法都比较费时费力，而且对核酸纯度的要求也比较高，目前应用范围相对较窄。RT-PCR是一种快速高效的检测病毒（Henson and French, 1993）和类病毒

（Hadidi and Yang, 1990; Yang et al., 1992; Levy, 1994）的方法，但是这一方法需要模板量比较大，而且在模板制备阶段（从样品中提取高纯度RNA作为RT-PCR的模板）比较耗时，目前类病毒纯化中常用的核酸提取方法是LiCl法等传统方法（Li et al., 1995），这些方法需要较多的样品（1～2片叶子）用于RNA提取，而且需要很多繁琐的步骤去除多糖多酚等RT-PCR过程中的抑制物（Hadidi and Candresse, 2003），这些繁琐的步骤也使得RNA提取的成本很高。随着检测技术的不断进步，一些类病毒RNA提取的方法已经不需要植物组织研磨，避开了繁琐的操作步骤，但这些方法需要专门的工具，如注射器、特制的滤纸等，成本相对也比较高（Hosokawa et al., 2005）。

本研究建立了一种快速高效的Sap-direct RT-PCR法，模板制备简单，成本极低，能同时检测至少3种锦紫苏类病毒（CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6）。此方法中，模板的制备仅需移液器和离心管等实验室常用工具和材料，移液器用于从植株上吸取微量的汁液作为RT-PCR的模板。根据锦紫苏类病毒属中的类病毒具有共同的CCR序列这一特性，本研究设计了能够检测多种锦紫苏类病毒的通用引物，结果表明：无需特殊设备和繁琐的模板制备步骤，仅通过一次简单的RT-PCR就能够检测到多种锦紫苏类病毒。

### **3.1.2** 样品来源

30 株用于批量检测的锦紫苏植株采自北京地区的一个花圃；用于优化方法的被不同

CbVds（CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6）侵染的锦紫苏为长期在温室内培育的植株。

### **3.1.3** 不同稀释梯度下类病毒的检测结果

分别从被CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6侵染的锦紫苏上吸取植株的汁液（包括茎部汁液和叶片上的汁液），稀释10倍、100倍和1000倍后分别作为模板进行RT-PCR。[如图3-1](#_bookmark66)a所示，多次重复的实验结果表明：稀释100倍的汁液作为模板时，扩增条带最清楚。



图3-1 Sap-direct RT-PCR法条件优化及检测结果

Fig. 3-1 Results of Sap-direct RT-PCR on coleus plants

M: D2000 DNA marker；PC：阳性对照（LiCl法从被CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6同时侵染的锦紫苏植株中提取的RNA作为模板进行RT-PCR的结果）；NC：阴性对照（从健康锦紫苏样品中提取的RNA作为模板进行RT-PCR的结果）。（a）：不同稀释梯度下样品中类病毒的检测结果，1\*：未稀释汁液作为RT-PCR的模板；10\*：稀释10倍的汁液作为模板；

100\*：稀释100倍的汁液作为模板；1000\*：稀释1000倍的汁液作为模板。（b）不同组织（茎、新叶、老叶）中类病毒的检测结果。（c）Sap-direct RT-PCR法与斑点杂交法在不同样品中的比较结果，1～3：Sap-direct法从被CbVds侵染的锦紫苏植株中提取的RNA作为模板进行RT-PCR的结果；1：同时感染CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6的锦紫苏植株；2：被CbVd-1侵染的锦紫苏植株；3：被CbVd-5和CbVd-6同时侵染的锦紫苏植株。

### **3.1.4** 不同组织中类病毒的检测结果

从锦紫苏的茎和叶中吸取汁液作为RT-PCR的模板，不管是老叶还是嫩叶，只要汁液保存得当并稀释到合适的浓度，均能扩增到清晰的锦紫苏类病毒条带。RT-PCR结果显示：从茎中吸取汁液作为模板时扩增到的目的条带最清楚，其次是老叶，最后是新叶（[图3-1](#_bookmark66)b）。也就是说，由于茎中的汁液杂质较少，从茎中吸取的汁液最适宜作为Sap-direct RT-PCR的模板。从健康锦紫苏样品中吸取的汁液作为模板时没有扩增到任何条带，从被CbVd-1侵染的锦紫苏中吸取的汁液作为模板时仅扩增到CbVd-1，从被CbVd-5和CbVd-6同时侵染的锦紫苏植株中吸取的汁液作为模板时仅扩增到CbVd-5和CbVd-6，而且，相应的条带均比较清晰，易于区分（[图3-1](#_bookmark66)c），这说明Sap-direct RT-PCR的准确度较高。

表3-1 Sap-direct RT-PCR法与斑点杂交法比较结果

Table 3-1 Detection results of CbVds using Dot-blot hybridization and Sap-direct RT-PCR

―\*‖号样品表示Sap-direct RT-PCR法与斑点杂交法检测结果不一致的样品。



植物的汁液中存在很多RT-PCR的抑制物，比如多糖、多酚等，这些抑制物能够导致样品中类病毒的检测结果呈假阴性，因此，将植物中直接吸取的汁液进行稀释是此方法中必不可少的步骤，通过稀释可以使类病毒RNA 的浓度与抑制物的浓度达到平衡，从而不影响

RT-PCR的检测结果。本研究中，虽然所有的锦紫苏样品采自不同的季节和不同的地点，每个样品上类病毒的浓度也不尽相同，但检测结果表明，虽然有很少的样品在植物汁液稀释

10倍或1000倍的时候得到最理想的扩增结果，但几乎所有样品上吸取的汁液稀释100倍后均可以得到理想的扩增结果。

### **3.1.5** **Sap-direct RT-PCR**法与斑点杂交法比较

[如图3-1](#_bookmark66)c所示，斑点杂交结果中呈阳性的样品用Sap-direct RT-PCR法检测时，结果也呈阳性，将RT-PCR扩增到的3种目的片段进行克隆，每个条带对应的类病毒分别送3个阳性克隆去公司测序，序列分析结果表明：琼脂糖凝胶电泳结果中的三个条带从下到上依次为CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6。即Sap-direct RT-PCR法和斑点杂交法的检测结果一致，能够准确的扩增到相应锦紫苏类病毒的目的片段。批量检测实验中，斑点杂交检测结果显示：30个锦紫苏样品中，29个呈CbVd-1阳性，16个呈CbVd-5阳性，15个呈CbVd-6阳性；Sap-direct RT-PCR法检测结果表明：30个锦紫苏样品中，29个呈CbVd-1阳性，16个呈CbVd-5和CbVd-6阳性。也就是说，除了20号样品之外，其他样品用两种方法的检测结果一致（[表3-1](#_bookmark68)）；20号样品虽然在斑点杂交检测结果中呈阴性，但Sap-direct RT-PCR法检测结果中呈阳性，可能原因为20号样品中CbVd-6的浓度太低，达不到斑点杂交的要求，但可以满足Sap-direct RT-PCR法的要求，因为此法只需要微量的RNA即可有效扩增到目的片段，这意味着Sap-direct RT-PCR法比斑点杂交法更为灵敏。

### **3.1.6** 结论

Sap-direct RT-PCR法中模板制备阶段非常方便，无需研磨抽提，只需从锦紫苏植株的茎或叶片中直接获取汁液即可作为RT-PCR的模板。自然状态下，类病毒以一种稳定的二级结构存在，植物中大量的RNA酶也不能将其降解（Steger and Riesner, 2003），因此，从植物中吸取的汁液放在离心管中后，类病毒RNA能够存活很久而不被降解。本研究中，从锦紫苏茎和叶片上吸取的汁液能够在-20℃长期存放，最长可以达到一年之久，然而，室温条件下，却不能超过两个小时，4℃或0 ℃冷藏也最多只能存放6个小时。值得注意的是，从锦紫苏植株中吸取的汁液稀释不同梯度后只能使用一次，重复使用时检测结果将不准确。所以，为保险起见，锦紫苏的汁液最好是现用现取，取完样品立即做RT-PCR的结果最为可靠。如果采集地点距离实验室比较远，可以将锦紫苏的茎秆或叶片采集后带回实验室再吸取汁液，由于类病毒能在植株样本中存活很久，在样品变干之前吸取汁液即可进行RT-PCR。

根据不同的需要，目前RT-PCR检测方法中有很多种DNA聚合酶可以选择，本研究中尝试了很多种DNA聚合酶，结果表明：KOD-Plus-Neo DNA聚合酶的扩增效率最高，检测

结果也最为可靠。很多园艺植物跟锦紫苏一样，茎和叶片多汁，很容易就能吸取到其汁液；而移液器是分子生物学实验中最为常用的实验工具之一，操作起来比注射器、刀片等其他工具更为方便（Hosokawa et al., 2005），而且吸取汁液后，移液器很容易就能将吸头从离心管中去掉，因此，与其他方法相比，此法取样快速、操作简单。

批量检测实验结果显示，尽管植物中类病毒的浓度高低不同，但Sap-direct RT-PCR法能够准确地从不同的锦紫苏样品中检测到不同的锦紫苏类病毒（[图3-1](#_bookmark66)c, [表3-1](#_bookmark68)），与其他方法相比较，此法不仅快速简单，仅需要一次简单的RT-PCR即可完成检测，而且不需要纯化模板，只需微量的汁液即可，因此，特别适合大量样品的检测；另外，Sap-direct RT-PCR法扩增到的目的片段可以直接进行克隆测序，与常规的克隆测序方法相比较，省时省力。自

2009年中国学者首次报道CbVd-5和CbVd-6以来，世界上其他国家鲜有这两种类病毒的报道，本研究中建立的Sap-direct RT-PCR法可以快速有效地确定这两种类病毒的发生分布情况，且核酸提取成本极低。

虽然锦紫苏类病毒的致病机理还不清楚，很多情况下，它们在植株上呈潜伏侵染，不引起明显的症状，但是，我们不能忽视对其进行检验检疫和防治，因为虽然目前没有发现CbVds在锦紫苏上引起严重病害，但这并不代表它们不在其他作物上引起病害。比如，啤酒花矮化类病毒（HSVd）在葡萄上呈潜伏侵染，但却可以在啤酒花上造成严重病害（Sano et al., 1985; Sasaki and Shikata, 1977），因此，本研究中锦紫苏类病毒快速检测方法的建立，对CbVds的检疫和防治具有重要意义。另外，此法对其他类病毒，乃至病毒快速检测方法的建立也具有重要的参考作用。

## **3.2** 通用探针快速杂交法

### **3.2.1** 前言

由于类病毒是一类裸露的RNA分子，不编码任何蛋白，因此病毒检测中常用的低成本的生物学检测试剂盒无法在类病毒上应用。类病毒检测的常用的方法包括生物学接种检测法和一些分子生物学方法，如包括二维电泳和正反向电泳在内的聚丙烯酰胺凝胶电泳法

（Welnicki and Hiruki, 1992; Schumacher et al., 1983, 1986）、RT-PCR法、分子杂交法等。然而，生物学方法耗时又耗力，指示植物的病害症状受环境因素影响较大，且不是所有的类病毒都有良好的指示植物；聚丙烯酰胺凝胶电泳法一次能检测的样品数目太少，因此，成本低、可靠性强、灵敏度高的快速检测方法越来越受到欢迎。近年来，RT-PCR和分子杂交法由于检测速度快、灵敏度高等优点在植物病毒和类病毒的检测中得到了越来越广泛的应用

(Henson and French, 1993; Hadidi and Yang, 1990; Yang et al., 1992; Levy, 1994; Owens and

Diener, 1981; Jiang et al., 2011b）。PCR技术由于其灵敏度高、操作简单方便，已成为类病毒诊断过程中的常用技术，但也是由于其灵敏度高，样品/模板中有一点污染都会造成假阳性检测结果或非特异性扩增片段；而模板中的抑制剂又会导致不能扩增到目的片段，极易造成假阴性检测结果。近年来，为解决这些问题，一些新的PCR技术不断发展起来，如LAMP和real-time PCR等技术都可以很大程度上解决PCR污染的问题（Boonham et al., 2004; Boubourakas et al., 2009; Monger et al., 2010; Luigi and Faggioli, 2011），但是由于其成本太高而得不到广泛的应用。相反，利用地高辛标记的探针进行的分子杂交技术由于成本较低、一次能检测大量样品、可操作性强、检测结果可靠等优点而得到了越来越广泛的应用（Herranz et al., 2005; Cohen et al., 2006; Aparicio et al., 2008; Lin et al., 2011）。

传统意义上，一种特异探针只能检测一种类病毒。作为马铃薯纺锤块茎类病毒科的类病毒，所有的锦紫苏类病毒具有共同的CCR，由于CCR的序列相同，理论上讲，利用该序列制备的探针能够检测全部具有该序列的类病毒，本研究中构建了一种地高辛标记的通用探针，称作8CCR探针，它可以通过一次杂交同时检测多种锦紫苏类病毒。

### **3.2.2** 样品来源

从北京、天津、福建和海南采集了100株锦紫苏样品用于本研究中的批量检测实验；用于优化方法的被不同CbVds（CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6）侵染的锦紫苏为长期在温室内培养的植株。

### **3.2.3** **8CCR**探针的灵敏度

本实验从分别感染CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的锦紫苏植株中提取总RNA，稀释不同的梯度后，分别用CbVds特异探针和8CCR通用探针进行杂交，从而对CbVds特异探针和8CCR通用探针的灵敏度和准确性进行比较。

锦紫苏样品中提取的RNA稀释到100、10-1、10-2、10-3、10-4，经甲醛变性后，用移液器分别吸取2.5μl点到5张相同的杂交膜上（Hybond-N+），室温风干后，紫外交联（1,200×100

J/cm2）3分钟，其中4张膜分别用CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的特异探针进行杂交，最后一张膜用8CCR通用探针进行杂交。结果如[图3-2](#_bookmark75)所示，虽然部分样品中CbVd-5和CbVd-6的杂交信号不太清楚，但CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5、CbVd-6的特异探针和8CCR通用探针都能够检测到10-3稀释梯度（大约100 pg）的类病毒RNA（[图3-2](#_bookmark75)a, b），也就是说，8CCR通用探针的灵敏度和准确性与CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6特异探针相同。



图3-2 CbVds特异探针和8CCR通用探针灵敏度和准确性比较

Fig. 3-2 Comparison of specificity and the sensitivity between individual probes

（a）：CbVds特异探针（Specific probes）；(b)：8CCR通用探针（8CCR-probe）

### **3.2.4** **8CCR**探针的可靠性

本研究通过Northern杂交进一步明确了8CCR通用探针的可靠性和有效性。从4株分别被CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6侵染的锦紫苏中利用LiCl法提取低分子量RNA，各取5µl后混合，根据Schumacher等的方法进行二维电泳（Schumacher et al., 1983）。电泳完毕进行转膜，转膜后采用银染色法对聚丙烯酰胺凝胶进行染色（Machida et al., 2008）。另外，本研究还从6株被不同类病毒侵染的锦紫苏中抽提低分子量RNA后在8 M尿素变性条件下（5%聚丙烯酰胺凝胶）直接电泳，电泳完毕后利用滤纸转膜，转膜后同样采用银染色法对聚丙烯酰胺凝胶进行染色。以上转膜后的杂交膜均用地高辛标记的8CCR通用探针进行杂交，结果如[图3-3](#_bookmark77)所示，二维电泳能够清楚地区分四种锦紫苏类病毒，凝胶染色结果中显示的条带按照分子量大小排列，从左到右依次为CbVd-3、CbVd-6、CbVd-5和CbVd-1（[图3-3](#_bookmark77)a1），杂交结果中的条带与凝胶染色结果中的条带一一对应，即二维电泳及杂交结果显示：

8CCR通用探针可同时检测不同的锦紫苏类病毒。此外，二维电泳结果还显示，RNA 抽提混合物中CbVd-5的浓度相对较高，杂交结果与凝胶染色结果一致。Northern杂交结果显示，地高辛标记的8CCR通用探针能够与膜上的CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6准确地杂合，根据分子量大小，Northern杂交结果中从下到上的条带依次对应对应CbVd-1、CbVd-5、CbVd-6和CbVd-3[（图3-3](#_bookmark77)a2, b2），因此，8CCR通用探针不仅可以同时检测不同的类病毒，而且可以区分不同类病毒的大小。



图3-3 8CCR通用探针的可靠性

Fig. 3-3 Reliability of the universal probe(8CCR-probe)

从4株别被CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6侵染的锦紫苏中提取RNA混合后进行二维电泳（a1），转膜后利用地高辛标记的8CCR通用探针进行杂交（a2），聚丙烯酰胺凝胶利用银染法进行染色。横向和纵向的长箭头分别指示二维电泳时一维和二维的电泳方向，短箭头分别表示CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的条带位置。不同锦紫苏样品RNA提取物混合后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果（b1）和转膜后利用地高辛标记的8CCR通用探针进行杂交的结果（b2）；1～2：感染CbVd-1+CbVd-5的锦紫苏样品；3～6：分别感染CbVd-1、CbVd-5、CbVd-6和CbVd-3的锦紫苏样品；7：CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6 RNA提取物的混合样品。

### **3.2.5** 批量检测结果

为进一步验证8CCR通用探针在田间样品中的检测效果，本研究从北京、天津、福建和海南采集了100株锦紫苏样品（包括市售品种和野生品种），所有样品中低分子量RNA的提取均采用Li等报道的LiCl法（Li et al., 1995）。所有样品都分别采用地高辛标记的CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6特异探针以及8CCR通用探针进行斑点杂交。

表3-2 100个锦紫苏样品的杂交检测结果

Table 3-2 Detection results for CbVds from 100 coleus samples using hybridization.



利用CbVds特异性探针进行的杂交结果显示，100个锦紫苏样品中，仅有1个样品呈CbVd-3阳性，1个样品呈CbVd-1+CbVd-6阳性，4个样品呈CbVd-5+CbVd-6阳性，15个样品呈CbVd-1+CbVd-5+CbVd-6阳性，34个样品呈CbVd-1阳性；8CCR通用探针杂交结果显示，55个样品呈CbVds阳性[（表3-2](#_bookmark79)），与CbVds特异性探针杂交结果一致：CbVds特异性探针杂交结果中的阳性样品在利用8CCR通用探针杂交时均呈阳性，而CbVds特异性探针杂交结果中的阴性样品在利用8CCR通用探针杂交时均为阴性，由此，田间样品检测结果进一步证实了8CCR通用探针灵敏度高、可靠性强。

本研究从四个不同的地方采集的锦紫苏样品中，多数呈CbVd-5+CbVd-6阳性的样品同时呈CbVd-1阳性，而多数呈CbVd-1阳性的样品都是单独侵染的，这意味着CbVd-1可能是目前已知的锦紫苏类病毒中分布最为广泛的类病毒种，其次是CbVd-5和CbVd-6。最近，中国北京和海南的样品中分别检测到了CbVd-2和CbVd-3，检测结果显示，这两种类病毒的侵染率极低（Fu et al., 2011; Jiang et al., 2011a），本研究中采集的100份锦紫苏样品中，仅有一个样品呈CbVd-3阳性，所有样品中均没有检测到CbVd-2，此结果进一步说明了CbVd-2和CbVd-3的分布非常有限，它们可能适应能力较差，存活率不高，也可能存在特殊的传播机制。

总之，从中国四个不同的地方采集到的100个锦紫苏样品中，利用CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6特异探针进行杂交时结果呈阳性的样品，在利用8CCR通用探针杂交时均呈现CbVds阳性，而特异探针中无信号的样品在用8CCR通用探针杂交时均呈阴性，这进一步证实了利用8CCR探针进行杂交时得到的结果是可靠的。

### **3.2.6** 结论

锦紫苏类病毒属的类病毒具有共同的CCR，本研究利用CCR上游的32个碱基分别构建了其2倍、4倍、6倍和8倍的多聚体，以此为模板，制备了2CCR、4CCR、6CCR和8CCR通用探针用于锦紫苏类病毒的杂交检测实验，以研究探针长度对杂交结果的影响，检测结果表明：杂交信号的强度与探针长度呈正相关，利用8CCR探针进行杂交的结果最为清楚，虽然定影后的胶片背景有些深，但8CCR探针仍是最佳选择。另外，本研究中也对杂交温度进行了优化，8CCR通用探针的杂交实验分别在在50 ℃、52 ℃、54 ℃、56 ℃、58 ℃、60 ℃、

62℃和65℃进行，结果显示，温度越低，杂交信号越强，但由于随着温度降低杂交背景也越深，杂交信号清晰度不能保证；温度越高，杂交背景较浅，但杂交信号也相对较弱；经过多次重复实验，根据杂交信号和杂交背景的比较结果，最终选定56℃是利用8CCR通用探针进行杂交的最佳温度。本研究中，56 ℃下进行的斑点杂交和Northern杂交结果显示：8CCR

通用探针至少能够同时检测4种锦紫苏类病毒，一次斑点杂交就可以确定样品中是否携带锦紫苏类病毒，检测出CbVds阳性样品，一次Northern杂交就可以检测出样品中CbVds的种类，CbVds种类较多时还能粗略比较样品中类病毒的浓度大小（[图3-3](#_bookmark77)a2, b2），此法快速简单，灵敏度高，可靠性强。

锦紫苏类病毒分子间具有高效重组的特性，例如，CbVd-2和CbVd-6是自然状态下的类病毒重组体，而人工构建的锦紫苏类病毒嵌合体CbVd-4经体外实验证明具有生物学活性

（Spieker, 1996b; Hou et al., 2009b），因此，锦紫苏类病毒中可能存在还未发现的分子内或分子间重组体，更重要的是，锦紫苏类病毒分子内或分子间的重组可能会产生新的类病毒种，由于它们具有共同的CCR，本研究建立的8CCR通用探针杂交法将会检测到这些可能存在的未知类病毒新种。

目前，锦紫苏中共发现了6种类病毒（CbVd-1～CbVd-6），多数情况下，CbVds在锦紫苏上不引起明显的病害症状，虽然它们的致病机理和寄主范围有待进一步的研究，然而，其检验检疫和防治不能被忽视，随着农业全球化的发展，越来越多的植物材料在世界各国间进行交换，一定程度上也加大了类病毒病害的流行。因此，快速简便、高灵敏度的有效检测手段对类病毒检验检疫和无毒苗木检测具有重要意义。

与利用特异性探针进行的传统杂交方法相比，一次杂交实验检测多种类病毒能够极大的降低成本、节省时间、节省劳动力（Cohen et al., 2006; Lin et al., 2011）。本研究中，根据锦紫苏类病毒共有的CCR序列构建了8CCR通用探针，通过一次杂交能够检测出样品中所有的锦紫苏类病毒，虽然本研究中采集的样品中都没有检测到CbVd-2和CbVd-4，无法明确此方法是否能够检测到这两种类病毒，但田间实验结果证实该方法可以一次检测出样品中存在的所有的4 种锦紫苏类病毒，因此，8CCR 通用探针杂交法具有很高的准确性，是检测

CbVds有效可行的方法，此方法的建立有助于快速调查锦紫苏样品中类病毒的有无、种类及发生分布情况。本研究中的结果对柑橘等其他作物上的类病毒乃至病毒的检测都具有非常重要的参考作用。

本文中的相关研究成果已经发表在Journal of Virological Methods上(Jiang et al., 2011b; Jiang et al., 2013)。

## **4.1** 样品来源

**4 锦紫苏类病毒发生分布调查**

2010年到2012年，从中国12个省市地区采集了825份锦紫苏样品（[图4-1](#_bookmark83)a）；2010

年到2011年，从印度海德拉巴市采集锦紫苏样品60份，从印度尼西亚爪哇岛采集锦紫苏样品3[份（图4-1](#_bookmark83)b）。样品采集后，利用变色硅胶干燥，长期置于-80 ℃保存。

本研究采用LiCl法对样品中的低分子量RNA进行提取（Li et al., 1995）。



图4-1 中国地区锦紫苏样品的采集地点分布图

Fig. 4-1 Location map of coleus samples from China

a：从中国12个省市地区共计采集825份锦紫苏样品（地图中不同的颜色表示不同的样品采集地区）；b：从中国12个省市地区及印度和印度尼西亚采集锦紫苏样品的数目。

## **4.2** 检测结果

利用CbVd-1～CbVd-6 的特异探针对所有的锦紫苏样品进行斑点杂交，部分样品利用

CbVd-1 和CbVd-5 特异探针进行杂交的结果[如图4-2](#_bookmark85) 所示；杂交信号模糊的样品将利用

CbVds通用引物（Jiang et al., 2011b）通过RT-PCR进行进一步的鉴定。



图4-2 北京地区部分样品利用CbVd-1和CbVd-5进行斑点杂交的检测结果

Fig. 4-2 Dot-blot hybridization results using CbVd-1 and CbVd-5 specific probes for some samples collected from Beijing

利用CbVd-1和CbVd-5特异性探针对北京地区部分样品进行了斑点杂交，结果如上图所示，杂交信号模糊的样品（[图4-2](#_bookmark85)中红色圆圈部分）利用CbVds通用引物（[表2-1](#_bookmark48)）通过RT-PCR作了进一步的鉴定（[图4-3](#_bookmark86)）。



图4-3 不同地区采集的部分样品中利用通用引物进行的RT-PCR结果

Fig. 4-3 RT-PCR results using the universal primers for the coleus samples

M: D2000 plus DNA marker；1～9：分别感染CbVd-1、CbVd-2、CbVd-3、CbVd-5、CbVd-6、CbVd-5+ CbVd-6、CbVd-1、CbVd-1+ CbVd-6和CbVd-5+ CbVd-6的样品；NC: 健康样品。

本研究利用CbVd-1～CbVd-6特异探针对所有样品进行了斑点杂交，并利用CbVds通用引物/特异引物通过RT-PCR做了进一步的验证，结果如[表4-1](#_bookmark87)所示，CbVds在中国已经广泛存在：十二个省市地区中除了辽宁省的18份样品全部呈CbVds阴性外，其余地区均存在CbVds；湖北地区的32个样品全部呈CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6阳性；海南地区36份样品全部呈CbVd-1阳性；北京地区231份样品中，208份感染CbVd-1, 200份感染CbVd-5，

198份感染CbVd-6；采自北京、河北、广东和海南等地的锦紫苏样品中CbVds感染率都非

常高。

表4-1 锦紫苏样品检测结果（斑点杂交法和RT-PCR法）

Table 4-1 Detection results of CbVds using Dot-blot hybridization and RT-PCR



除辽宁和云南外，采自中国其他10个地区的锦紫苏样品中大部分样品都呈CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6阳性，而且这三种类病毒的侵染率比其他类病毒的侵染率高得多，分别高达65%、68.8%和62%；采自中国地区的825份锦紫苏样品中，通过杂交和RT-PCR方法分别在北京和海南的一份样品中检测到CbVd-3；可能是由于CbVd-2浓度较低、杂交方法灵敏度相对较低的缘故，利用杂交方法在所有的样品中均没有检测到CbVd-2，通过RT-PCR方法在海南的一份样品中检测到CbVd-2，其余样品中均未检测到CbVd-2和CbVd-3；所有样品均呈CbVd-4阴性；以上结果说明CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6的分布范围比较广，而CbVd-2和CbVd-3分布范围较窄，CbVd-4则至今未从自然生长的锦紫苏中检测到。

采自印度和印度尼西亚的63份样品中，印度的57份样品和印度尼西亚的3份样品呈

CbVd-1阳性；印度的28份样品和印度尼西亚的3份样品呈CbVd-5阳性；采自印度和印度尼西亚的样品中没有检测到其它类病毒，包括在中国广泛存在的CbVd-6。

## **4.3** 锦紫苏类病毒在中国、印度和印度尼西亚的首次报道

### **4.3.1** **CbVd-2**在中国的首次报道

采自中国、印度和印度尼西亚的888份样品中，利用CbVd-2的特异性引[物（表2-2](#_bookmark49)），仅从海南的1个样品中扩增到目的片段，克隆到pMD18-T载体上后筛选了12个阳性克隆进行测序。序列分析结果表明：本研究中得到的CbVd-2序列与Genbank中已经报道的CbVd-2参考序列（NC003682）相似性为99～100%。这是CbVd-2在中国的首次报道，也是CbVd-2在世界上的第二次报道。

本研究中的部分结果已经发表在Plant Disease上（Fu et al., 2011）。

### **4.3.2** **CbVd-3**在中国的首次报道

采自中国、印度和印度尼西亚的888份样品中，利用CbVd-3特异性探针通过杂交方法分别在中国北京和海南的一株样品中检测到CbVd-3。利用CbVds通用引物（[表2-1](#_bookmark48)）对阳性样品中的CbVd-3进行RT-PCR扩增，目的片段克隆到pMD18-T载体上后每个样品送5个阳性克隆进行测序。序列分析结果表明：本研究中得到的CbVd-3序列与Genbank中报道的参考序列（NC003683）相似性为99.72～100%，主流序列已经提交至Genbank，序列号为HQ727548,这是CbVd-3在中国的首次报道，也是世界上除德国之外的唯一报道。

本研究中的部分结果已经发表在Journal of Plant Pathology上（Jiang et al., 2011a）。

### **4.3.3** **CbVd-1**在印度尼西亚的首次报道

虽然锦紫苏的原产国是印度尼西亚，世界上很多国家已经报道了CbVd-1，但印度尼西亚还没有关于锦紫苏类病毒的报道。本研究利用地高辛标记的CbVd-1特异探针对采自印度尼西亚的3个锦紫苏样品进行了斑点杂交检测，3个样品均呈CbVd-1阳性，利用CbVds通[用引物（表2-1](#_bookmark48)）通过RT-PCR对阳性样品进行克隆测序，序列分析结果表明，采自印度尼西亚的3个样品均感染了CbVd-1，这是锦紫苏类病毒在印度尼西亚的首次报道。

### **4.3.4** **CbVd-5**在印度和印度尼西亚的首次报道

利用CbVd-5特异性探针对采自印度的60个样品和采自印度尼西亚的3个样品进行了斑点杂交，结果显示，采自印度的60个样品中有28个样品感染了CbVd-5，印度尼西亚的

3个样品全部呈CbVd-5阳性。随机选取一个采自印度和印度尼西亚的样品，利用CbVds通用引物[（表2-1](#_bookmark48)）对阳性样品进行了RT-PCR扩增，扩增片段纯化后连接到pMD18-T载体上后转化到*E. coli* DH5α感受态细胞内进行培养，每个样品筛选5个阳性克隆进行测序，序列

分析结果表明，本研究中得到的CbVd-5序列与Genbank中报道的参考序列（NC012127）相似性为97.8～100%。这是CbVd-5在印度和印度尼西亚的首次报道，也是在中国以外的其他国家中首次发现该类病毒。

本研究中的部分结果已经发表在Plant Disease上（Jiang et al., 2013）。

## **4.4** 结论

本研究对中国12个省市地区的锦紫苏类病毒进行了发生分布调查，同时，也对采自印度和印度尼西亚的63份样品进行了检测。检测结果表明：CbVd-1和CbVd-5在这三个国家中均已发生，而且在中国已经广泛发生；CbVd-6在中国地区的样品中侵染率较高，但印度和印度尼西亚的样品中均没有检测到CbVd-6. CbVd-6是中国报道的类病毒新种，目前还没有在其他国家报道过，扩大调查范围，加大样品采集数量将有助于明确CbVd-6是否在其他国家中存在。CbVd-2和CbVd-3是德国报道的新种，自1996年报道以来，就没有别的国家报道过此类病毒，本研究从海南和北京的锦紫苏样品中检测到了CbVd-2和CbVd-3，是这两种类病毒在中国的首次报道。CbVd-4是人工构建的类病毒嵌合体，虽然它接种锦紫苏后具有生物学活性，但目前为止还没有从自然寄主中分离到，调查范围的不断扩大将有助于明确自然界中是否存在这一类病毒嵌合体。随着检测技术的不断进步以及调查范围的不断扩大，人类将发现越来越多的类病毒新种，也将会有越来越多的国家报道类病毒的发生分布情况，考虑到CbVds高效重组的特性，对其进行深入研究将有助于揭示RNA重组的机理。

## **5.1** 前言

**5锦紫苏类病毒与寄主**

与多数的RNA病毒和少数DNA病毒一样，自然界中类病毒以准种模式存在，一个准种就是由一系列相关/相近的基因型组成的群体。由于类病毒序列较短，一般来讲，一个类病毒种一般由多个序列组成，其中有一个或多个主流序列，其它序列与主流序列仅有几个碱基的差异（Codoner et al., 2006; Domingo et al., 2006），这可能是由于类病毒复制过程中为适应环境而不断发生突变的结果，也可能是不同寄主给予类病毒不同选择压力的结果（Gago et al., 2009; Flores et al., 2011; Tessitori et al., 2013）。

有侵染性的类病毒cDNA质粒及其体外转录产物已经被广泛用于验证类病毒侵染性的生物学实验，类病毒cDNA侵染性克隆和它们各自的转录产物在序列上一般需要大于一个单位长度，但有时某种类病毒的单体也会具有侵染性；目前有很多类病毒的正链和负链二倍体用于类病毒侵染性研究，通过柯赫氏法则验证该类病毒的生物学活性（Tabler and Sanger, 1984; Visvader et al., 1985）。由于锦紫苏类病毒通常是混合侵染的，通过一般的抽提方法难以将混合侵染的锦紫苏类病毒中的某一种类病毒纯化出来，然而，侵染性克隆技术可以解决这一问题。侵染性克隆技术不仅可以得到某一种类病毒的纯化产物，而且没有混入其它类病毒的风险。此技术已经成功运用于CbVd-1和CbVd-3这两种锦紫苏类病毒：Fonseca和Spieker分别利用CbVd-1的二倍体/多于一倍体的cDNA质粒和CbVd-3二倍体质粒的体外转录产物，通过柯赫氏法则验证了这两种类病毒的生物学活性（Fonseca et al., 1994; Spieker, 1996a；

Spieker et al., 1996)。

侵染活性是类病毒的一个重要特征，包括侵染寄主植物后起始复制的能力、子代类病毒的产量等（Diener, 1987; Semancik, 1987）；然而，自2009年首次报道以来，目前为止还没有关于CbVd-5和CbVd-6侵染性方面的报道。本研究体外构建了CbVd-1～CbVd-6的二倍体cDNA质粒，并通过T7启动子和RNA聚合酶得到它们的体外转录产物，接种锦紫苏后对其生物学活性进行了研究。结果表明：尽管侵染时间和侵染能力不同，本研究中构建的CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的二倍体cDNA及其体外转录产物均具有侵染活性，而且它们的寄主范围不同。接种一年后，本研究还对CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的子代序列进行了分析，结果表明：虽然四种类病毒能够侵染同一种锦紫苏，但在寄主的选择压力下，它们形成了各不相同的种群结构。

## **5.2** 方法

### **5.2.1** 侵染性克隆的构建及**RNA**体外转录

选取自然界中分离到的CbVd-1、CbVd-2、CbVd-3、CbVd-5、CbVd-6主流序列（Genbank序列登录号：DQ178395; X95365; HQ727548; X97202; FJ151370; FJ615419），利用酶切、连

接等方法构建其二倍体cDNA，然后连入pGEM-T[载体（图5-1](#_bookmark98)），由于迄今为止没有从自然界中分离到CbVd-4，因此，CbVd-4的二倍体cDNA序列（Genbank序列登录号：NC003882）由金唯智生物科技有限公司合成，并克隆到pGEM-T载体上。所有CbVds二倍体重组质粒经限制性内切酶线性化之后，根据体外转录试剂盒说明书利用T7 RNA聚合酶进行体外转录，转录产物直接接种锦紫苏无毒苗。



图5-1 CbVd二倍体cDNA重组质粒构建示意图

Fig. 5-1 Schematic for the construction of CbVds dimer

### **5.2.2** 体外转录产物接种

分别筛选5个品种（“红叶圆边”、“红叶皱边”、“红叶绿皱边”、“红叶绿圆边”

和“绿叶皱边”）的锦紫苏无毒苗各8株（共计40株）用于接种。40株锦紫苏无毒苗分为

8组，每一组包含5株不同品种的锦紫苏无毒苗，放于同一温室中培养，待长至6片叶子以上时进行机械接种。将CbVd-1～CbVd-6的体外转录产物RNA各1µg分别溶于1×TE缓冲液（10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0），利用切割法先后对6组锦紫苏无毒苗的茎部进行接种，剩余的两组锦紫苏无毒苗中一组作为阳性对照接种从感染CbVd-1的锦紫苏上抽提的低分子量RNA，一组用于接种1×TE缓冲液作为阴性对照，接种后的锦紫苏幼苗分别放于同一温室（28～30 ℃）的不同隔间内培养。

### **5.2.3** 类病毒**RNA**提取

接种植物中的低分子量RNA根据Li等报道的LiCl方法从新鲜叶片中提取（Li et al., 1995）。

### **5.2.4** 接种植物中**CbVds**的检测

由于RT-PCR等方法中易出现假阳性结果，因此，为保证检测结果的准确性，本研究采用2D-PAGE和杂交方法对接种后的锦紫苏植株进行类病毒检测。为实时监测接种植物中锦紫苏类病毒的侵染情况，每隔15天左右从接种后的锦紫苏植株上取一次样品，利用LiCl法抽提后通过2D-PAGE和杂交进行检测（上样量：5µl ≈1µg），预杂交和杂交按照2.2.10中报道的方法进行操作。

### **5.2.5** **CbVd-5**和**CbVd-6**种传实验

从CbVd-5和CbVd-6单独侵染的锦紫苏植株上收集种子后种于温室中，3个月后各随机选取50株锦紫苏幼苗，利用分子杂交和RT-PCR方法对幼苗中是否存在锦紫苏类病毒进行检测。

### **5.2.6** 克隆测序及序列分析

利用锦紫苏类病毒通用引物（Jiang et al., 2011b）和Ex-Taq DNA聚合酶（Takara, Japan）通过RT-PCR方法对同一品种（“红叶绿皱边”）中的子代CbVds进行扩增，扩增得到的目的片段连入pMD18-T载体上后，通过菌液PCR方法筛选阳性克隆，最后每种类病毒分别选取20个阳性克隆进行测序及序列分析。

## **5.3** 结果

### **5.3.1** **CbVds**侵染性克隆的构建

[如图5-2](#_bookmark106)所示，利用5.2.1中的酶切、连接等方法，本研究成功构建了CbVd-1～CbVd-6

的二倍体cDNA质粒。



图5-2 CbVd-1～CbVd-6单倍体片段（左图）和二倍体cDNA质粒菌液PCR检测结果（右图）

Fig. 5-2 CbVd-1～CbVd-6 DNA monomer (left) and colony PCR results of dimer (right)

M: D2000 plus DNA marker；1～6：CbVd-1～CbVd-6单倍体片段（左图）和二倍体cDNA

质粒的菌液PCR检测结果（右图）；NC：阴性对照。

### **5.3.2** **CbVds**二倍体体外转录产物的侵染性

利用2D-PAGE和杂交方法，CbVd-1～CbVd-6二倍体体外转录产物接种锦紫苏无毒苗后第45天、60天、80天和300天分别在接种植株中第一次检测到了CbVd-5、CbVd-1、CbVd-6和CbVd-3[（图5-3](#_bookmark109)），然而，接种植物中始终没有检测到CbVd-2和CbVd-4。检测结果显示，接种一个月以后，作为阳性对照的5棵锦紫苏植株全部感染了CbVd-1; 65天后，接种CbVd-5的5棵锦紫苏植株全部感染了CbVd-5, 80天后，接种CbVd-1的锦紫苏植株也全部感染了CbVd-1，然而，接种一年后，接种CbVd-6的5棵锦紫苏植株中仅有2棵感染了CbVd-6，而接种CbVd-3的锦紫苏植株中仅有1棵感染了CbVd-3（[图5-4](#_bookmark110)），因此，本研究初步的结果表明：CbVd-1和CbVd-5的寄主范围比较广泛，而且其寄主适应性也较强；而CbVd-6，特别是CbVd-3的寄主范围相对较窄。迄今为止，从中国采集的上千个锦紫苏样品中，仅在2个样品中检测到了CbVd-3，寄主范围窄可能是其低侵染率的原因之一。CbVd-3的检出率低，却是CbVds重组事件中最为活跃的锦紫苏类病毒，因此，对其进行进一步的深入研究将有助于CbVds重组机理的阐明。

### **5.3.3** **CbVds**子代序列分析

由于自然界中类病毒是以准种模式存在的，对寄主个体中每种类病毒分离物突变频率及范围的分析对研究类病毒在寄主中的进化历程具有重要意义。本研究中对CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6在接种植株中的子代类病毒进行了克隆，每种类病毒随机筛选20个阳性克隆送测序，并进行了序列分析。

二维电泳和分子杂交结果显示，CbVd-5是接种植株中第一个检测到的类病毒，但是序列分析结果显示，相对于接种源序列，CbVd-5的子代序列是最为保守的：送测序的20个阳性克隆中，19个克隆的序列与接种源序列（Genbank序列登录号：FJ151370）完全一致，即：主流序列与接种源序列相同；仅有一个克隆的序列（[图5-4](#_bookmark110), 5-1）在第25位碱基的位置（类病毒二级结构的致病区，P区）发生了变异（G25→A）。

与CbVd-5相似，CbVd-1的子代中包含5种序列，送测序的20个阳性克隆中，80%的克隆序列相同，并与接种源序列（Genbank序列登录号：DQ178395）一致，即CbVd-1子代的主流序列与接种源序列相同；其余4个克隆中有2个克隆的序[列（图5-4,](#_bookmark110) 1-1, 1-2）与主

流序列仅相差一个碱基，但彼此之间各不相同，其余2个克隆的序列与主流序列分别相差 2

个（[0,](#_bookmark110) 1-3）和3个（[图5-4,](#_bookmark110) 1-4）碱基。

福建农林大学2013届博士毕业论文



图5-3 锦紫苏类病毒接种植物的2D-PAGE及杂交检测结果

Fig. 5-3 Detection results for the RNA extracts from progeny plants using 2D-PAGE and hybridization

CbVd-1～CbVd-6接种锦紫苏幼苗一年后，2D-PAGE和分子杂交（利用CbVd-1～CbVd-6特异探针）检测结果，二维电泳后进行转膜，然后利用银染色法对聚丙烯酰胺凝胶进行染色。红色箭头表示2D-PAGE 和杂交结果中的目的条带；标有―First‖和―Second‖的箭头分别表示二维电泳中一维和二维的方向。

59



图5-4 CbVds接种源序列与子代序列分析结果

Fig. 5-4 Bioassay chart for the four species of CbVds and their progeny viroid populations

空心箭头表示每个接种源分别接种到5 棵锦紫苏无毒苗上；实心彩色箭头表示代号为

―C‖的植株中对应的子代类病毒的序列组成及类型；A–E分别表示5种不同的锦紫苏幼苗（A，

―红叶圆边‖、B，―红叶皱边‖、C，―红叶绿皱边‖、D，―红叶绿圆边‖、E，―绿叶皱边‖），A1-A4表示四株来自同一母体A的锦紫苏幼苗；每个植株下面的数字代表第一次检测到类病毒时的接种后天数；右边方框中内容表示左边数字的时间单位；饼形图中空白部分表示CbVds子代序列与接种源序列相同，彩色部分分别表示不同的序列类型。

虽然CbVd-6的子代序列类型较多，与接种源序列（Genbank序列登录号：FJ615419）相差较大，但是子代的主流序列仍然与接种源序列一致，且主流序列占总子代序列的60%

（12/20）；除了主流序列之外，另外有2个阳性克隆的序列相同（[图5-4,](#_bookmark110) 6-1），与主流序列仅相差1个碱基（第108位的G发生碱基替换，变为A）；其余的6个阳性克隆的序列与主流序列仅相差一个碱基，但彼此之间各不相同（[图5-4,](#_bookmark110) 6-2～6-7）。

与接种源序列（Genbank序列登录号：HQ727548）相比，CbVd-3的子代序列发生了很大的变化，且子代序列中找不到接种源序列。送测序的20个阳性克隆中，16个克隆（80%）的序列相同，但与接种源序列相差一个碱基（3-1, 213A→G），即：CbVd-3子代序列的主流序列与接种源序列不同。主流序列之外的4个克隆中有3个克隆与主流序列相差一个碱基，

与接种源序列相差2个碱基；其余的1个克隆与主流序列相差两个碱基，与接种源序列相差

3个碱基。有趣的是，与接种源序列相比，所有的CbVd-3子代序列第213位置的碱基均由

A变为G。

CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的接种源序列均是从自然界锦紫苏中分离到的主流序列，且该自然寄主与本研究中的5种锦紫苏幼苗品种不同。虽然本研究中的CbVds子代序列相对于接种源序列都发生了变化，但CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6子代序列中的主流序列与接种源序列一致，但CbVd-3子代序列的主流序列与接种源序列不同，因此，CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6优胜略汰下来的序列变体相对保守，而CbVd-3的序列变体相对变化较大，且寄主范围相对较窄。

Keese和Symons将类病毒二级结构分为五个区：左末端区（TL区）、致病区（P区）、中央保守区（C区）、可变区（V区）和右末端区（TR区）五个部分（Keese and Symons, 1985），本研究中子代类病毒序列变异较大，P区和V区似乎是两个变异高频区，这与V区是类病毒中变化最大的区域，P区其次这一理论假设相吻合（Keese and Symons, 1985），这些变化的碱基影响其二级结构发生相应的变化，但是这些变化与致病性之间的关系有待进一步的研究。虽然这些变化可能是PCR过程中的错配引起的，但是基于以下理由，我们认为它们是自然界中存在的突变：首先，本研究中使用的高保真Ex-Taq DNA聚合酶的错配率低于10-5，发生错配的频率极低；其次，一个类病毒中，多条序列中存在共同的变异位点，例如，CbVd-3所有子代序列第213位的碱基A均变成了G。

### **5.3.4** **CbVd-5**和**CbVd-6**种传实验结果

利用RNA探针通过杂交方法对感染CbVd-5和CbVd-6的锦紫苏植株种子种出的幼苗进行检测，结果显示：50株来自感染CbVd-5的锦紫苏植株的种子种出的幼苗中有24株呈CbVd-5阳性，侵染率为48%；50株来自感染CbVd-6的锦紫苏植株的种子种出的幼苗中有

29株呈CbVd-6阳性，侵染率为58%；由此可知，CbVd-5和CbVd-6可以通过种子进行传播。

## **5.4** 结论

本研究中，利用CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的二倍体体外转录产物通过柯赫氏法则证明了这四种类病毒的侵染活性，虽然接种后第一次检测到CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的时间不同，但利用二倍体体外转录产物接种一年后的检测结果表明，四种类病毒都能侵染―红叶绿皱边‖的锦紫苏幼苗。CbVd-2和CbVd-4未能侵染本研究中的5种锦紫苏幼苗，可能这5种锦紫苏都不是本研究中CbVd-2和CbVd-4分离物的合适寄主，它们的侵染活性有待进一步的研究，但本研究利用侵染性克隆技术证明了四种锦紫苏类病毒的侵染活性，特别是确认了CbVd-5和CbVd-6的生物学活性，证明了它们是新的类病毒，为其分类地位的确立提供了确凿的分子生物学证据。还对CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6 的

的子代类病毒进行了序列分析。另外，本研究还通过分子杂交和RT-PCR方法证明了CbVd-5

和CbVd-6可以通过种子进行传播，

如同其他的类病毒和大部分的RNA病毒一样，CbVds种群结构多样，自然界中也以准种的形式存在，一方面，类病毒在侵染不同的寄主时需要经历一个瓶颈期，以便于进化出适应此寄主的变体，比如本研究中的CbVd-3，从自然界中分离到的主流序列接种到另外一个锦紫苏寄主上时其子代序列发生了变化，变化后的序列可能有利于CbVd-3适应新寄主，这种变化可以用遗传漂变假设解释，在类病毒不断地传播和系统侵染寄主的过程中，在寄主的选择压力下，优胜略汰的结果就是适应寄主环境的变体才能最终存活下来（Bernad et al., 2009; Palacio-Bielsa et al., 2004），不同的寄主可能会导致RNA病原物侵染过程中的突变率不同，世界上已经报道了很多有关RNA病毒和类病毒寄主适应性变异的例子（Garcia-Arenal et al., 2003），本研究中CbVd-3的子代序列分析结果为其提供了进一步的实验证据。然而，另一方面，我们还对CbVd-5在五种锦紫苏植株上的子代类病毒序列进行了分析，结果发现，尽管接种的锦紫苏幼苗品种不同，CbVd-5的子代序列并没有表现出较大的多样性，所有锦紫苏植株上的CbVd-5主流序列都与接种源序列相同，主流序列之外的其他序列与接种源序列相差不大，也就是说，CbVd-5并没有因为适应不同的寄主而表现出较多的变异。目前，造成CbVd-5和CbVd-3之间这种差异的机制还不清楚，但可以排除非环境因素所致，因为所有的锦紫苏植株都是在相同的环境中培养的。可能在侵染和复制过程中，即使是同一个寄主，它对不同的类病毒的选择压力也不相同，而不同的类病毒用于复制和侵染的寄主因子也可能各不相同，也许，类病毒本身的性质对其在寄主中的复制和侵染具有重要作用。因此，从某种意义上讲，本研究的结果说明锦紫苏类病毒属的类病毒侵染寄主后的序列多样性不仅取决于侵染的寄主，也决定于类病毒本身的性质。

# **6** 全文总结

## **6.1** **CbVds**快速检测方法的建立

本研究建立了锦紫苏类病毒的两种快速检测方法：Sap-direct RT-PCR法和分子杂交快速检测法。Sap-direct RT-PCR方法中，利用分子生物学实验室的常用工具—移液器，直接从锦紫苏茎部和叶片中吸取汁液作为cDNA合成的模板，根据CbVds中央保守区序列设计通用引物，一次RT-PCR就可以同时扩增出至少3种锦紫苏类病毒。RT-PCR结果显示：Sap-direct RT-PCR可以同时检测出CbVd-1、CbVd-5和CbVd-6三种类病毒；利用Sap-direct RT-PCR法和斑点杂交法对30个锦紫苏样品进行的批量检测实验结果表明，此法灵敏度高，结果准确可靠，又可最大限度地避免样品之间的交叉污染，可用于CbVds的快速检测。此外，Sap-direct RT-PCR法还可以对CbVds进行快速鉴定和克隆。

分子杂交快速检测方法中，将锦紫苏类病毒中央保守区的部分序列扩增八倍后用于制备可以检测所有锦紫苏类病毒的地高辛标记的RNA探针，称作8CCR探针，该探针可以通过一次斑点杂交检测多个样品是否被CbVds侵染；Northern杂交结果显示，8CCR探针可以同时检测出至少4种锦紫苏类病毒；批量检测实验结果表明，此方法灵敏度高，简单快速，成本低，是快速准确地检测锦紫苏类病毒的有效方法。

本研究建立了两种能够快速方便的检测锦紫苏类病毒的有效方法，研究结果对其他类病毒，甚至病毒快速检测方法的建立具有重要的参考作用。

## **6.2** **CbVds**发生分布调查

本研究对采自中国12个省市地区的825份锦紫苏样品、印度的60份样品和印度尼西亚的3份样品进行了检测，结果显示：从三个国家采集的样品中，大部分都感染了CbVd-1和CbVd-5，且感染率较高，印度尼西亚的3份样品全部呈CbVd-1和CbVd-5阳性；CbVd-6是由中国首次报道的类病毒新种，中国地区采集的825份样品中有551份呈CbVd-6阳性，尽管印度尼西亚是锦紫苏的原产国，但本研究中从印度和印度尼西亚的样品中都没有检测到CbVd-6；中国地区采集的825份样品中仅有两份样品呈CbVd-3阳性；中国海南的一份样品呈CbVd-2阳性；本研究是CbVd-2和CbVd-3在中国的首次报道，CbVd-1和CbVd-5在印度尼西亚的首次报道，也是CbVd-5在印度的首次报道；所有的888份样品中均没有检测到CbVd-4。随着检测技术的进步，以及样品量的加大，将会有更多的国家报道类病毒的发生和分布，也可能会发现更多的类病毒新种。

## **6.3** 锦紫苏类病毒与寄主

本研究构建了CbVd-1～CbVd-6的二倍体cDNA重组质粒，利用其体外转录产物接种不同的锦紫苏无毒苗，对其生物学活性进行了研究，并对CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的子代类病毒进行了分析。CbVds生物学活性实验结果显示，利用CbVd-1～CbVd-6的二倍体体外转录产物接种5种不同的锦紫苏无毒苗后45天到300天内，分别从接种植株中检测到了CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6，但至今始终没有检测到CbVd-2和CbVd-4，可能本研究中选择的5种锦紫苏幼苗不是这两种类病毒的最适寄主。接种一年后，对CbVd-1、CbVd-3、CbVd-5和CbVd-6的子代序列进行了分析，结果表明，锦紫苏类病毒的序列多样性不仅决定于寄主的选择压力，还决定于类病毒本身的性质。另外，本研究还确认了CbVd-5和CbVd-6可以通过种子进行传播。

总而言之，越来越多的研究数据表明，锦紫苏类病毒已经在世界范围内广泛存在，考虑到其传播和重组的能力极强，世界范围内植物材料交换越来越频繁，各国必须加强对CbVds的检验检疫。另外，本研究大量的CbVds序列信息极大地丰富了Genbank中关于锦紫苏类病毒的数据量，对锦紫苏类病毒乃至RNA病毒的重组机制及致病机理的阐明提供了重要的实验证据。

参考文献

[1] Adkar-Purushothama C R, Nagaraja H, Sreenivasa T, Sano T. 2013, First report of *Coleus blumei viroid* infecting coleus in India [J]. Plant Disease, 97: 149.

[2] Amari K, Gomez G, Myrta A, Di Terlizzi B, Pallás V. 2001, The molecular characterization of 16 new sequence variants of *Hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule [J]. Journal of General Virology, 82: 953-962.

[3] Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M. 2007, Spread of *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity [J]. Plant Disease, 91: 47-50.

[4] Aparicio F, Soler S, Aramburu J, Galipienso L, Nuez F, Pallás V, López Carmelo. 2008, Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labeled polyprobe [J]. European Journal of Plant Pathology, 123: 117-123.

[5] Bani-Hashemian S M, Barbosa C J, Serra P, Duran-Vila N. 2010, Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids [J]. Plant Pathology, 59: 413-421.

[6] Bani-Hashemian S M. 2009, Respuesta de distintos genotipos de cıtricos y generos afines a la infeccion con viroids [D]. Spanish: Universidad Politecnica de Valencia.

*[7]* Barba M, Ragozzino E, Faggioli F. 2007, Pollen transmission of *Peach latent mosaic viroid*

[J]. Journal of Plant Pathology, 89: 287-289.

[8] Bartlett J M S, Stirling D. 2003, A short history of the polymerase chain reaction [J]. PCR Protocol, 226: 3-6.

[9] Baumstark T, Riesner D. 1995, Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of *Potato spindle tuber viroid* is a substrate for processing in a potato nuclear extract [J]. Nucleic Acids Research, 23: 4246-4254.

[10] Bernad L, Duran-Vila N, Elena S F. 2009, Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of *Citrus exocortis viroid* [J]. Journal of General Virology, 90: 2040-2049.

[11] Bolduc F, Hoareau C, St-Pierre P, Perreault J P. 2010, In-depth sequencing of the siRNAs

Associated with *Peach latent mosaic viroid* infection [J]. BMC Molecular Biology, 11: 16.

[12] Boonham N, Perez L. G, Mendez M S, Lilia Peraltab E, Blockleya A, Walsha K, Barkera I, Mumforda R A. 2004, Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Journal of Virological Methods, 116: 139-146.

[13] Boubourakas I N, Fukuta S, Kyriakopoulou P E. 2009, Sensitive and rapid detection of *Peach latent mosaic viroid* by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Virological Methods, 160: 63-68.

[14] Branch A D, Benenfeld B J, Robertson H D. 1988, Evidence for a single rolling circle in the replication of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85: 9128-9132.

[15] Branch A D, Robertson H D. 1984, A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs [J]. Science, 223: 450-455.

[16] Bussiere F, Lehoux J, Thompson D A, Skrzeczkowski L J, Perreault J. 1999, Subcellular localization and rolling circle replication of *Peach latent mosaic viroid*: hallmarks of group A viroids [J]. Journal of Virology, 73: 6357-6360.

[17] Bussiere F, Ouellet J, Cote F, Lévesque D, Perreault J P. 2000, Mapping in solution shows the *Peach latent mosaic viroid* to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure [J]. Journal of Virology, 74: 2647-2654.

*[18]* Candresse T, Macquaire G, Brault V, Monsion M, Dunez J. 1990, 32P- and biotin-labelled *in*

*Vitro* transcribed cRNA probes for the detection of *Potato spindle tuber viroid* and

*Chrysanthemum stunt viroid* [J]. Research in Virology, 141: 97-107.

[19] Chen X. 2009, Small RNAs and their role in plant development [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 35: 21-44.

[20] Chung B N, Choi G S. 2008, Incidence of *Coleus blumei viroid* 1 in seeds of commercial coleus in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 24: 305-308.

[21] Codoñer F M, Daròs J A, SoléR V, Elena S F. 2006, The fittest versus the flattest: Experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens [J]. PLoS Pathogens, 2: 1187-1193.

[22] Cohen O, Batuman O, Stanbekova G, Sano T, Mawassi M, Bar-Joseph M. 2006, Construction of a multi-probe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees

[J]. Virus Genes, 33: 287-292.

[23] Csorba T, Pantaleo V, Burgyan J. 2009, RNA silencing: an antiviral mechanism [J].

Advances in Virus Research, 75: 35-71.

[24] Daros J A, Marcos J F, Hernandez C, Flores R. 1994, Replication of *Avocado sunblotch viroid*: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 12813-12817.

[25] De Bokx J A, Pirone P G. 1981, Transmission of *Potato spindle tuber viroid* by aphids [J].

Netherlands Journal of Plant Pathology, 87: 31.

[26] De la Pena M, Navarro B, Flores R. 1999, Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the in vivo branched RNA conformation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 9960-9965.

[27] Desvignes J C, Grasseau N, Boye R, Cornaggia D. 1999, Biological properties of *Apple scar skin viroid*: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission [J]. Plant Disease, 83: 768-772.

[28] Di Serio F, Gisel A, Navarro B, Delgado S, Martníez de Alba A E, Donvito G, Flores R.

2009, Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: Implications for their genesis and for pathogenesis [J]. PLoS One, 4: 7539.

[29] Di Serio F, Martınez de Alba A E, Navarro B, Gisel A, Flores R. 2010, RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid [J]. Journal of Virology, 84: 2477-2489.

[30] Diener T O. 2003, Discovering viroids—a personal perspective [J]. Nature Reviews Microbiology, 1: 75-80.

[31] Diener T O. 1971, Potato spindle tuber" virus": IV. A replicating, low molecular weight RNA [J]. Virology, 45: 411-428.

[32] Diener T O. 1972, *Potato spindle tuber viroid* VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA [J]. Virology, 50: 606-609.

[33] Diener T O. 1987, The viroids. New York: Plenum Press.

[34] Diener T O. 1986, Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83: 58-62.

[35] Ding B, Itaya A, Zhong X H. 2005, Viroid trafficking: a small RNA makes a big move [J].

Current Opinion in Plant Biology, 8: 606-612.

[36] Ding B, Kwon M O, Hammond R, Owens R A. 1997, Cell-to-cell movement of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Plant Journal, 12: 931-936.

[37] Ding B. 2009, The biology of viroid-host interactions [J]. Annual Review of Phytopathology, 47: 105-131.

[38] Ding S W, Voinnet O. 2007, Antiviral immunity directed by small RNAs [J]. Cell, 130: 413-426.

[39] Ding S W. 2000, RNA silencing [J]. Current Opinion in Biotechnology, 11: 152-156.

[40] Dingley A J, Steger G, Esters B, Riesner D, Grzesiek S. 2003, Structural characterization of the 69 nucleotide *Potato spindle tuber viroid* left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis [J]. Journal of Molecular Biology, 334: 751-767.

[41] Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Pérez A, Garcaí-Arriaza J, Arias A. 2006,

Viruses as quasispecies: biological implications [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 299: 51-82.

[42] Dunoyer P, Voinnet O. 2009, Movement of RNA silencing between plant cells: is the question now behind us[J]. TrendsinPlantScience, 14: 643-644.

[43] Fadda Z, Daros J A, Flores R, Duran-Vila N. 2003, Identification in eggplant of a variant of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure [J]. Virus Research, 97: 145-149.

[44] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. 2005, Virus Taxonomy. In: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Press, pp. 1145-1160.

[45] Feldstein P A, Hu Y, Owens R A. 1998, Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 6560-6565.

[46] Flores R, Dars J A, Hernandez C. 2000, *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes [J]. Advances in Virus Research, 55: 271-323.

[47] Flores R, Di Serio F, Navarro B, Duran-Vila N, Owens R A. 2011, Viroids and viroid diseases of plants. In Hurst C J, Studies in viral ecology: Microbial and botanical host systems [M], Hoboken, NJ, USA: Wiley Press, pp. 311-346.

[48] Flores R, Hernández C, Martníez de Alba A E, Daròs JA, Di Serio F. 2005, Viroids and viroid-host interactions [J]. Annual Review of Phytopathology, 43: 117-139.

[49] Flores R, Randles J W, Bar-Josef M, Diener T O. 2000, Subviral agents: viroids. In van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, Bishop E B, Carstens M K, Estes S M, Lemon D J, Mcgeoch J, Mailoff M A, Mayo C R P, Wickner R B. Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Press, pp. 1009-1024.

[50] Fonseca M E N, Boiteux L S, Singh R P, Kitajima, E W. 1989, A small viroid in coleus species from Brazil [J]. Fitopatol Bras, 14: 94-96.

[51] Fonseca M E N, Marcellino L H, Kitajima E W, Boiteux LS. 1994, Nucleotide sequence of the original Brazilian isolate of coleus yellow viroid from *Solenostemon scutellarioides* and infectivity of its complementary DNA [J]. Journal of General Virology, 75: 1447-1449.

[52] Fu F H, Li S F, Jiang D M, Wang H Q, Liu A Q, Sang L W. 2011, First report of *Coleus blumei viroid* 2 from commercial coleus in China [J]. Plant Disease, 95: 494.

[53] Gago S, Elena S F, Flores R, Sanjuán R. 2009, Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid [J]. Science, 323: 1308.

[54] Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica J M. 2003, Variation and evolution of plant virus populations [J]. International Microbiology, 6: 225-232.

[55] Gas M E, Hernandez C, Flores R, Daròs J A. 2007, Processing of nuclear viroids in vivo: An interplay between RNA conformations [J]. PLoS Pathogens, 3: 1813-1826.

[56] Gómez G, Martníez G, Pallás V. 2009, Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways [J]. Trends in Plant Science, 14: 264-269.

[57] Gómez G, Martníez G, Pallás V. 2008, Viroid -induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity [J]. Plant Physiology, 148: 414-423.

[58] Gora-Sochacka A. 2004, Viroids: unusual small pathogenic RNAs [J]. Acta Biochimica

Polonica, 51: 587-607.

[59] Gross H J, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H, Sanger H. 1978, Nucleotide sequence and secondary structure of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Nature, 273: 203-208.

[60] Hadidi A, Candresse T. 2003, Polymerase chain reaction. In: Hadidi A, Flores R, Randles J W, et al. Viroids [M]. Collingwood, Australia: CSIRO Press, pp. 115-122.

[61] Hadidi A, Hansen A J, Parish C L, Yang X. 1991, Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees [J]. Research in Virology, 42: 289-296.

[62] Hadidi A, Huang C, Hammond R W, Hashimoto J. 1990, Homology of the agent associated with dapple apple disease to *Apple scar skin viroid* and molecular detection of these viroids [J]. Phytopathology, 80: 263-268.

[63] Hadidi A, Yang X C. 1990, Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification [J]. Journal of Virological Methods, 30: 261-269.

[64] Hammann C, Steger G. 2012, Viroid-specific small RNA in plant disease [J]. RNA Biology, 9: 1-11.

[65] Hammond R W. 1994, Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effects of apparently lethal mutations [J]. Virology, 201: 36-45.

[66] Hassen I F, Kummert J, Marbot S, Fakhfakh H, Marrakchi M, Jijakli M H. 2004, First report of *Pear blister canker viroid*, *Peach latent mosaic viroid*, and *Hop stunt viroid* infecting fruit trees in Tunisia [J]. Plant Disease, 88: 1164.

[67] Hataya T. 1999, Recent research in viroid diseases and diagnosis [J]. Research in Virology, 1: 789-815.

[68] Henson J M, French R. 1993, The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J].

Annual Review of Phytopathology, 31: 81-100.

[69] Hernandez C, Flores R. 1992, Plus and minus RNAs of *Peach latent mosaic viroid* self-cleave in vitro via hammerhead structures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 3711-3715.

[70] Herranz M C, Sanchez-Navarro J A, Aparicio F, Aparicio F, Pallás V. 2005, Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or‗polyprobe' [J]. Journal of Virological Methods, 124: 49-55.

[71] Hosokawa W, Matsushita Y, Uchida H, Yazawa S. 2005, Direct RT-PCR method for

Detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue [J]. Journal of Virological Methods, 131: 28-33.

[72] Hou W Y, Li S F, Wu Z J, Jiang D M, Sano T. 2009b, *Coleus blumei viroid* 6: a new tentative member of the genus *Coleviroid* derived from natural genome shuffling [J]. Archives of Virology, 154: 993-997.

[73] Hou W Y, Sano T, Li S F, Wu Z J, Li L, Li S F. 2009a, Identification and characterization of a new *Coleviroid* (CbVd-5) [J]. Archives of Virology, 154: 315-320.

[74] Howell W E, Burgess J, Mink G I, Skrzeczkowski L J, Zhang Y P. 1998, Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy [J]. Acta Horticulturae, 472: 641-646.

[75] Howell W E, Skrzeczkowski L J, Mink G I, Nunez A, Wessels T. 1995, Non-transmission of *Apple scar skin viroid* and *Peach latent mosaic viroid* through seed [J]. Acta Horticulturae, 472: 635-639.

[76] Hutchins C J, Keese P, Visvader J E, Rathjen P D, McInnes J L, Symons R H. 1985, Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids [J]. [Plant Molecular Biology,](http://www.springerlink.com/link.asp?id=100330) 4: 293-304.

[77] Huttinga H. 1996, Sensitivity of indexing procedures for viruses and viroids [J]. Advances in Botanical Research, 23: 59-71.

[78] Ishiguro A, Sano T, Harada Y. 1996, Nucleotide sequence and host range of a coleus viroid isolated from coleus (*Coleus blumei Benth*) in Japan [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 62: 84-86.

[79] Itaya A, Folimonov A, Matsuda Y, Nelson R S, Ding B. 2001, *Potato spindle tuber viroid* as inducer of RNA silencing in infected tomato [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14: 1332-1334.

[80] Jiang D M, Hou W Y, Sano T, Kang N, Qin L, Wu Z J, Li S F, Xie L H. 2013, Rapid detection and identification of viroids in the genus *Coleviroid* using a universal probe [J]. Journal of Virological Methods, 187: 321-326.

[81] Jiang D M, Li S F, Fu F H, Wu Z J, Xie L H. 2013, First report of *Coleus blumei viroid* 5 from *Coleus blumei* in India and Indonesia [J]. Plant Disease, 97: 561.

[82] Jiang D M, Li S F, Fu F H, Wu Z J, Xie L H. 2011a, First reported occurrence of *Coleus blumei viroid* 3 in China [J]. Joruanl of Plant Pathology, 93: S4.82.

[83] Jiang D M, Wu Z J, Xie L H, Sano T, Li S F. 2011b, Sap-direct RT-PCR for the rapid detection of *Coleus blumei viroids* of the genus *Coleviroid* from natural host plants [J]. Journal of Virological Methods, 174: 123-127.

[84] Keese P, Symons R H. 1985, Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82: 4582-4586.

[85] Kennedy J S, Day M F, Eastop V F. 1962, A Conspectus of aphides as vectors of plant viruses [M]. London: Commonwealth Institute of Entomology Press.

[86] King A. M Q, Lefkowitz E M, Adams J, Carstens E B. 2011, Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). San Diego, CA: Elsevier Academic Press.

[87] Kofalvi S A, Marcos J F, Canizares M C, Pallás V, Candresse T. 1997, *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates [J]. Journal of General Virology, 78: 3177-3186.

[88] Koonjul P K, Brandt W F, Farrant J M, Lindsey G G. 1999, Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA [J]. Nucleic Acids Research, 27: 915-916.

[89] Kricka L J. 1992, Nonisotopic DNA Probing Techniques [M]. San Diego, CA: Academic Press.

[90] Kryczynski S, Paduch-Cichal E, Skzeczkowski L J. 1988, Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants [J]. Journal of Phytopathology, 121: 51-57.

[91] Lakshman D K, Hiruki C, Wu X N, Leung W C. 1986, Use of 32P RNA probes for the

Dot-hybridization detection of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Journal of Virological Methods, 14: 309-319.

[92] Levy L, Lee I M, Hadidi A. 1994, Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid and MLO nucleic acids [J]. Journal of Virological Methods, 49: 295-304.

[93] Li S F, Onodera S, Sano T, Yoshida K, Wang G Pi, Shikata E. 1995, Gene diagnosis of viroids: Comparison of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of *Hop stunt*, *Citrus exocortis* and *Apple scar skin viroid*s in

Their natural host plants [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 61: 381-390.

[94] Li S F, Su Q, Guo R. 2006, First report of *Coleus blumei viroid* from coleus in China [J].

Plant Pathology, 55: 565.

[95] Lin L M, Li R H, Mock R, Kinard G. 2011, Development of a polyprobe to detect six viroids of pome and stone fruit trees [J]. Journal of Virological Methods, 171: 91-97.

[96] Luigi M, Faggioli F. 2011, Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of *Peach latent mosaic viroid* [J]. European Journal of Plant Pathology, 130: 109-116.

[97] Machida S, Shibuya M, Sano T. 2008, Enrichment of viroid small RNAs by hybridization selection using biotinylated RNA transcripts to analyze viroid induced RNA silencing [J]. Journal of General Plant Pathology, 74: 203-207.

[98] Manalo G G, Estioko L P, Rodriguez R J B. 2000, Studies on the transmission of *Coconut cadang cadang viroid* [C]. Quezon City, Philippines: Report, Philippine Coconut Authority Press.

[99] Maniataki E, Tabler M, Tsagris M. 2003, Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with host protein VirP1 [J]. RNA, 9: 346-354.

[100] Markarian N, Li H W, Ding S W, Semancik J S. 2004, RNA silencing as related to viroid induced symptom expression [J]. Archives of Virology, 149: 397-406.

[101] Martníez de Alba A E, Flores R, Hernández C. 2002, Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing [J]. Journal of Virology, 76: 13094-13096.

[102] Martinez G, Donaire L, Llave C, Pallas V, Gomez G. 2010, High-throughput sequencing of *Hop stunt viroid* derived small RNAs from cucumber leaves and phloem [J]. Molecular Plant Pathology, 11: 347-359.

[103] Matoušek J, KozlováP, OrctováL, Schmitz A, Pesina K, Bannach O, Diermann N, Steger G, Riesner D. 2007, Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis [J]. Biological Chemistry, 388: 1-13.

[104] Melton D A, Krieg P A, Rebagliati M R, Maniatis T, Zinn K, Green M R. 1984, Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids

Containing a bacteriophage SP6 promoter [J]. Nucleic Acids Research, 12: 7035-7056.

[105] Monger W, Tomlinson J, Booonham N,, Marn M V, Plesko I M, Molinero-Demilly V, Tassus X, Meekes E, Toonen M, Papayiannis L, Perez-Egusquiza Z, Mehle N, Jansen C, Nielsen S L. 2010, Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of *Pospiviroids* [J]. Journal of Virological Methods, 169: 207-210.

[106] Morris T J, Smith E M. 1977, Potato spindle tuber disease: procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers [J]. Phytopathology, 67:145-150.

[107] Mullis K B. 1994, The polymerase chain reaction (Nobel Lecture) [J]. Angewandte Chemie International Edition, 33: 1209-1213.

[108] Nakahara K, Hataya T, Hayashi Y, Sugimoto T, Kimura I, Shikata E. 1998, A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Journal of Virological Methods, 71: 219-227.

[109] Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. 1999, A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 77: 47-58.

[110] Navarro B, Flores R. 1997, *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 11262-11267.

[111] Navarro B, Pantaleo V, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Di Serio F, Burgyán J .

2009, Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction [J]. PLoS One, 4: 7686.

[112] Navarro J A, Flores R. 2000, Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure [J]. EMBO Journal, 19: 2662-2670.

*[113]* Owens R A, Diener T O. 1981, Sensitive and rapid diagnosis of *Potato spindle tuber viroid*

Disease by nucleic acid hybridization [J]. Science, 213: 670-672.

[114] Owens R A, Hammond R W. 1987, Molecular biology of viroid-host interactions. In Diener T O. The viroids [M]. New York: Plenum Press, pp. 167-188.

[115] Palacio-Bielsa A, Romero-Durban J, Duran-Vila N. 2004, Characterization of citrus HSVd

Isolates [J]. Archives of Virology, 149: 537-552.

[116] Palukaitis P. 1987, *Potato spindle tuber viroid*: investigation of the long-distance, intra-plant transport route [J]. Virology, 158: 239-241.

[117] Papaefthimiou I, Hamilton A, Denti M, Baulcombe D, Tsagris M, Tabler M. 2001, Replicating *Potato spindle tuber viroid* RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing [J]. Nucleic Acids Research, 29: 2395-2400.

*[118]* Postman J D, Hadidi A. 1995, Elimination of *Apple scar skin viroid* from pears by *in vitro*

Thermo-therapy and apical meristem culture [J]. Acta Horticulturae, 386: 536-543.

[119] Ragozzino E, Faggioli F, Barba M. 2004, Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid* [J]. Journal of Virological Methods, 121: 25-29.

[120] Rodio M E, Delgado S, De Stradis A E, Gómez M D, Flores R, Di Serio F. 2007, A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development [J]. Plant Cell, 19: 3610-3626.

[121] Rosemarie W H, Rober A O. 2006, Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops [J]. APSnet Features, doi: 10.1094/APSnetFeature-2006-1106

[122] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N. 1985, Enzymic amplification ofß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. Science, 230: 1350-1354.

[123] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H

A. 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. Science, 239: 487-491.

[124] Salazar L F, Querci M, Bartolini I, Lazarte V. 1995, Aphid transmission of *Potato spindle tuber viroid* assisted by *Potato leafroll virus* [J]. Fitopatologia, 30: 56-58.

[125] Sanger H L, Klotz G, Riesner D, Gross H J, Kleinschmidt A K. 1976, Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73: 3852-3856.

[126] Sano T, Candresse T, Hammond R W, Diener T O, Owens R A. 1992, Identification of

Multiple structural domain regulating viroid pathogenicity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 10104-10108.

[127] Sano T, Hammond R W, Owens R A. 2003, Biotechnological approaches for controlling viroid diseases. In Hadidi A, Flores R, Randles J W, et al. Viroids [M]. Collingwood, Australia: CSIRO Press, pp. 343-349.

[128] Sano T, Ishiguro A. 1998, Viability and pathogenicity of inter-subgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication [J]. Virology, 240: 238-244.

[129] Sano T, Nagayama A, Ogawa T, Ishida I, Okada Y. 1997, Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to *Potato spindle tuber viroid* [J]. Nature Biotechnology, 15: 1290-1294.

[130] Sano T, Ohsima K, Htaya T, Meshi1 T, Ohno T, Okada Y. 1985, A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with *Hop stunt viroid* [J]. Journal of General Virology, 66: 333-338.

[131] Sasaki M, Shikata E. 1977, Studies on the host range of hop stunt disease in Japan [J].

Proceedings of the Japan Academy-Series B, 53: 103-108.

[132] Schnolzer M, Haas B, Raam K, Hofmann H, Sänger H L. 1985, Correlation between structure and pathogenicity of *Potato spindle tuber viroid* (PSTV) [J]. EMBO Journal, 4(9): 2181-2190.

[133] Schumacher J, Meyer N, Riesner D, Weidemann H L. 1986, Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by‗return'-gel electrophoresis [J]. Journal of Phytopathology, 115: 332-343.

[134] Schumacher J, Randles J W, Riesner D. 1983, A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids [J]. Analytical Biochemistry, 135: 288-295.

[135] Schuman G L, Tingey W M, Thurston H D. 1980, Evaluation of six insect pests for transmission of *Potato spindle tuber viroid* [J]. American Potato Journal, 57: 205-211.

[136] Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, et al. 2009, RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct [J]. Molecular Plant Pathology, 10: 459-469.

[137] Semancik J S, Szychowski J A, Rakowski A G, Ding B, Wang M B, Krczal G, Wassenegger M. 1993, Isolates of *Citrus exocortis viroid* recovered by host and tissue selection [J]. Journal of General Virology, 74: 2427-2436.

[138] Semancik J S. 1987, Viroids and viroid-like pathogens. Boca Raton: CRC Press.

[139] Serra P, Barbosa C J, Daròs J A, Flores R, Duran-Vila N. 2008, *Citrus viroid* V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid* [J]. Virology, 370: 102-112.

[140] Shamloul A M, Faggioli F, Keith J M, Hadidi A. 2002, A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid* [J]. Journal of Virological Methods, 105: 115-121.

[141] Singh R P, Boucher A, Singh A. 1991, High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of coleus in Canada [J]. Plant Disease, 75: 184-187.

[142] Singh R P, Boucher A, Somerville T H. 1992, Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen [J]. Plant Disease, 76: 951-953.

[143] Singh R P, Dilworth A D. 2009, *Tomato chlorotic dwarf viroid* in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed [J]. European Journal of Plant Pathology, 123: 111-116.

[144] Singh R P, Nie X, Singh M. 1999, *Tomato chlorotic dwarf viroid*: an evolutionary link in the origin of *pospiviroids* [J]. Journal of General Virology, 80: 2823-2828.

[145] Singh R P. 1970, Seed transmission of *Potato spindle tuber virus* in tomato and potato [J].

American Potato Journal, 47: 225-227.

[146] Smith K M. 1972, *Potato spindle tuber virus*. A textbook of plant virus diseases [M].

London: Longman Group Ltd Press, pp. 404-407.

[147] Spieker R L, Haas B, Charng Y, Freimüller K, S anger H L. 1990, Primary and secondary structure of a new viroid‗species' (CbVd-1) present in the *Coleus blumei* cultivar

‗Bienvenue' [J]. Nucleic Acids Research, 18: 3998.

[148] Spieker R L, Marinkovic S, Sanger H L. 1996, A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 3 from the *Coleus blumei* cultivar '*Fairway Ruby*' [J]. Archives of Virology, 141:

1377-1386.

[149] Spieker R L. 1991, A new class of viroids in *Coleus blumei*: Sequencing, cloning, structure/function-analysis by site-directed mutagenesis and expression in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Physiology, 22: 221-226.

[150] Spieker R L. 1996a, A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 1 from the *Coleus blumei* cultivar‗‗*Rainbow Gold*'‘[J]. Archives of Virology, 141: 2153-2161.

[151] Spieker R L. 1996b, *In vitro*-generated‗inverse' chimeric *Coleus blumei viroids* evolve in vivo into infectious RNA replicons [J]. Journal of General Virology, 77: 2839-2846.

[152] Staub U, Polivka H, Herrmann J V, Gross H J. 1995, Transmission of grapevine viroids is not likely to occur mechanically by regular pruning [J]. Vitis, 34: 119-123.

[153] Steger G, Riesner D. 2003, Molecular characteristics. In: Hadidi A, Flores R, Randles J W, et al. Viroids [M]. Collingwood, Australia: CSIRO Press, pp. 15-29.

[154] Strachan T, Read A P. 1999. Nucleic acid hybridization assays. In human molecular genetics [M]. New York: Wiley Press, Chapter 5.

[155] Tabler M, Sanger H L. 1984, Cloned single and double stranded cDNA copies of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious [J]. EMBO Journal, 3: 3055-3062.

[156] Tabler M, Tsagris M. 2004, Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents [J].

Trends in Plant Science, 9: 339-348.

[157] Tessitori M, Rizza S, Reina A, Causarano G, Di Serio F. 2013, The genetic diversity of *Citrus dwarfing viroid* populations is mainly dependent on the infected host species [J]. Journal of General Virology, 94: 687-693.

[158] Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. 2009, Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways [J]. International Journal of Developmental Biology, 53: 245-257.

[159] Visvader J E, Forster A C, Symons R H. 1985, Infectivity and *in vitro* mutagenesis of monomeric cDNA clones of *Citrus exocortis viroid* indicates the site of processing of viroid precursors [J]. Nucleic Acids Research, 13: 5843-5856.

[160] Visvader J H, Symons R H. 1986, Replication of *in vitro* constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulation domain of *Citrus exocortis viroid* [J]. EMBO

Journal, 5: 2051-2055.

[161] Voinnet O. 2008, Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants [J].

Trends in Plant Science, 11: 317-328.

[162] Wallace J M, Drake R J. 1962, A high rate of seed transmission of avocado sun-blotch virus from symptomless trees and the origin of such trees [J]. Phytopathology, 52: 237-241.

[163] Wang M B, Bian X Y, Wu L M, Liu L X, Smith N A, Isenegger D, Wu R M, Masuta C, Vance V B, Watson J M, Rezaian A, Dennis E S, Waterhouse P M. 2004, On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 3275-3280.

[164] Wang Q C, Valkonen J P T. 2009, Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method [J]. Trends in Plant Science, 14: 119-122.

[165] Wassenegger M, Spieker R L, Thalmeir S, Gast F U, Riedel L, Sänger H L. 1996, A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for Nicotiana tabacum [J]. Virology, 226: 191-197.

[166] Welnicki M, Hiruki C. Highly sensitive digoxigenin-labelled DNA probe for the detection of *Potato spindle tuber viroid* [J]. Journal of Virological Methods, 1992, 39: 91-99.

*[167]* Yang X, Hadidi A, Garnsey S M. 1992, Enzymatic cDNA amplification of *Citrus exocortis*

And *cachexia viroids* from infected citrus hosts [J]. Phytopathology, 82: 279-285.

[168] Zhang Z X, Peng S, Jiang D M, Pan S, Wang H Q, Li S F. 2012, Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants [J]. European Journal of Plant Pathology, 132: 9-16.

**附录1** 个人简介

姜冬梅，女，汉族，1984年出生于ft东省新泰市。

2006年6月毕业于ft东师范大学生物技术专业，获理学学士学位；

2009年6月毕业于福建农林大学微生物学专业，获理学硕士学位；

2010年9月于福建农林大学攻读微生物学博士学位，主要从事锦紫苏类病毒与寄主互作方面的研究。

博士期间发表的学术论文如下：

1. **Jiang Dongmei,** Hou Wanying, Sano Teruo, Kang Ni, Qin Lü, Wu Zujian, Xie Lianhui﹡ and Li Shifang﹡. 2013, Rapid detection and identification of viroids in the genus *Coleviroid* using a universal probe. ***Journal of Virological Methods***, 187(2): 321-326.

2. **Jiang Dongmei**, Wu Zujian, Xie Lianhui, Sano Teruo and Li Shifang﹡. 2011, Sap-direct

RT-PCR for the rapid detection of *Coleus blumei viroid*s of the genus *Coleviroid* from natural host plants. ***Journal of Virological Methods***, 174: 123-127.

3. **Jiang Dongmei,** Li Shifang, Fu Fanghong, Wu Zujian and Xie Lianhui﹡. 2013, First report of Coleus blumei viroid 5 from Coleus blumei in India and Indonesia. ***Plant Disease***, 97: 561.

4. **Jiang Dongmei,** Sano Teruo, Tsuji Masaharu, Araki Hiroyuki, Kyota Sagawa, Purushothama Charith Raj Adkar, Zhang Zhixiang, Guo Rui, Xie Lianhui, Wu Zujian, Wang Hongqing and Li Shifang﹡. 2012, Comprehensive diversity analysis of viroids infecting grapevine in China

And Japan. ***Virus Research***, 169 (1): 237-245.

5. **Jiang Dongmei**, Li Shifang﹡, Fu Fanghong, Wu Zujian and Xie Lianhui. 2011, First reported occurence of *Coleus blumei viroid* 3 in China. ***Journal of Plant Pathology***, 93(4): S4.82.

6. **Jiang Dongmei,** Wang Lihui, Niu Feiqing, Lu Meiguang, Wang Hongqing and Li Shifang﹡.

2013, Complete nucleotide sequences of two isolates of *Cherry green ring mottle virus* from peach (*Prunus persica*) in China. ***Archives of Virology***, 158: 707-710.

7. **Jiang Dongmei**, Li Shifang﹡, Wang Hongqing, Peng Shan, Guo Rui, Wu Zujian and Xie Lianhui. 2011, Population diversity of grapevine viroids in China. Viroids and Satellite, VI-PO43-3, Virology, pp. 139/178, Sapporo, Japan.

8. **Jiang Dongmei**, Fu Fanghong, Wu Zujian, Xie Lianhui and Li Shifang﹡. 2011, First report

of two species of the genus *Coleviroid* in China. 中国植物病理学会2011年会论文集, pp. 355.

附录1 个人简介

9. **Jiang Dongmei**, Hou Wanying, Wu Zujian, Xie Lianhui and Li Shifang﹡. 2012, A rapid detection of viroids in the genus *Coleviroid*. 中国植物病理学会2012年会论文集, pp. 204.

10. He Zhen, **Jiang Dongmei**, Liu Aiqin, Sang Liwei, Li Wenfeng and Li Shifang﹡. 2011, The complete sequence of *Cymbidium mosaic virus* from Vanilla fragrans in Hainan, China. ***Virus Genes***, 42: 40-443.

11. Zhang Yongjiang, Yin Jun, **Jiang Dongmei**, Xin Yanyan, Ding Fang, Deng Ziniu, Wang Guoping, Ma Xianfeng, Li Fang, Li Guifen, Li Mingfu, Li Shifang, Zhu Shuifang﹡. 2013, A universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level. ***PloS One***, 8(5): e64474.

12. Fu Fanghong, Li Shifang﹡, **Jiang Dongmei**, Wang Hongqing, Liu Aiqin and Sang Liwei. 2011, First report of *Coleus blumei viroid* 2 from commercial coleus in China. ***Plant Disease***, 95(4): 494.

13. Zhang Zhixiang, Peng Shan, **Jiang Dongmei**, Pan Song, Wang Hongqing and Li Shifang﹡.

2012, Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. ***European Journal of Plant Pathology***, 132: 9-16.

14. Ge Beibei, He Zhen, **Jiang Dongmei,** Zhang Zhixiang, Liu Guojie and Wang Hongqing﹡.

2012, Characterization and complete nucleotide sequence of *Potato virus* M isolated from tomato in China. ***Acta Virologica***, 56: 261-263.

15. Li Shifang﹡, Fu Fanghong, **Jiang Dongmei**, Wang Hongqing, Hou Wanying and Li Feng.

2011, Viroids of *Coleviroid* in China and India. Viroids and Satellite, VI-PO43-4, Virology, pp. 139/178, Sapporo, Japan.

16. Niu Feiqing, Pan Song, Wu Zujian, **Jiang Dongmei** and Li Shifang﹡. 2012, Complete

Nucleotide sequences of the genomes of two isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica*) in China. ***Archives of Virology***, 157(4): 783-786.

17. Niu Feiqing, Pan Song, Wu Zujian, **Jiang Dongmei** and Li Shifang﹡. 2012, First report of

*Apricot pseudo-chrolotic leaf spot virus* infection of peach in China. ***Journal of Plant Pathology***, 1(1): 1.

18. Li Wenfeng, He Zhen, Li Shifang﹡, Huang Yingkun, Zhang Zhixiang, **Jiang Dongmei**,

Wang Xiaoyan and Luo Zhiming. 2011, Molecular Characterization of a new strain of

*Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). ***Archives of Virology***, 156: 2101-2104.

致 **谢**

转眼间，博士生生活就要结束了，回忆起这几年的点点滴滴，感慨不已，欣慰之余而又庆幸无比。值得欣慰的是，我这几年的时间是在汗水和拼搏中度过的，学到了许多受益无穷的东西；庆幸的是我遇到了很多的良师益友，给我了很多的指引和帮助，使我能够顺利地完成学业，在此谨向他们表示最衷心的感谢！

本论文是在恩师谢联辉教授、李世访研究员和吴祖建研究员的悉心指导下完成的。导师们以其厚重的人格魅力、慎思明辨、诲人不倦的学术精神以及渊博的学识深深地影响了我，使我终身受益匪浅。他们在学术上给了我方向，生活中给了我温暖，行动上给了我勇气，处世上给了我榜样，让我能够充分体会到科研的魅力与乐趣。值此论文完成之际，谨将千言万语汇成最诚挚的谢忱献给我最尊敬的导师！

感谢中国农业科学院植物保护研究所分子病毒组的肖红老师，卢美光老师，中国农业大学王红清老师，福建农林大学植物病毒研究所谢荔岩老师，林奇英老师，何敦春老师，高芳銮老师等在日常科研工作和学习生活方面所给予的热心帮助。感谢福建农林大学郑立敏博士生，章松柏博士生，贾东升博士生，郑璐平博士生等在学习及生活中给予的帮助。感谢中国农业科学院植物保护研究所分子病毒组康妮实验员，张志想博士，王丽辉博士生，贺振博士生，葛蓓孛博士生，麦合木提江.米吉提博士生，丁英娜硕士生，于云硕士生，赵哲硕士生，王鹏硕士生，秦吕硕士生，李茜硕士生，陈姗姗硕士生，马宇欣硕士生，梁鹏博硕士生以及已经毕业的符方虹硕士，范宏艳硕士，牛飞庆硕士，吕文霞硕士，马伟学士，高蕊学士等，他们在学习和生活中曾给予了很大帮助。

感谢日本弘前大学农学与生命科学院Sano Teruo 教授和意大利蔬菜病毒研究所

Francesco Di Serio教授在论文撰写及实验技能方面给予的帮助。

感谢植物病虫害生物学国家重点实验室的吴茂森老师在实验仪器使用上提供的方便。感谢我的家人，学业的顺利完成离不开他们给予我的支持和关心，我将继续努力，不辜

负他们的期望。

衷心感谢在我攻读博士期间每一位关心过我、帮助过我、给过我鼎力支持而在此尚未提及的人们，你们的情意我将铭记于心！

最后，祝福所有帮助过我的老师、同学、朋友、亲人们，愿你们一生幸福！

姜冬梅

2013年5 月