

# 朱顶红褪绿环斑病毒在细角带蓟马中的 增殖规律研究\*

吴家琦<sup>1</sup>, 徐 烨<sup>2</sup>, 李永忠<sup>3\*\*</sup>, 刘雅婷<sup>1\*\*</sup>

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201;

3. 云南农业大学 烟草学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:**【目的】朱顶红褪绿环斑病毒 (*Hippeastrum chlorotic ringspot virus*, HCRV) 危害严重, 细角带蓟马 (*Taeniothrips eucharii*) 是其主要的传播媒介。明确 HCRV 病毒粒子在细角带蓟马体内的增殖规律, 为 HCRV 防控提供理论依据。【方法】应用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR), 结合 HCRV *N* 基因和细角带蓟马  $\beta$ -*actin* 基因特异性引物, 选用 SYBR Green 方法对获毒后不同虫龄细角带蓟马体内的 HCRV 含量进行定量分析。【结果】所建立的实时荧光定量方法可以准确特异地对细角带蓟马中的 HCRV 进行相对定量, 发现 1 龄若虫的 HCRV 核酸含量最低, 1 龄若虫、2 龄若虫及蛹中的病毒含量没有统计学差异, 成虫的 HCRV 核酸含量最高。【结论】细角带蓟马在获毒后, 体内 HCRV 核酸含量随着细角带蓟马的发育而增加。

**关键词:** 正番茄斑萎病毒属; 朱顶红褪绿环斑病毒; 细角带蓟马; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 433.89

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 01-0015-05

## Proliferative Rule of *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* in *Taeniothrips eucharii*

WU Jiaqi<sup>1</sup>, XU Ye<sup>2</sup>, LI Yongzhong<sup>3</sup>, LIU Yating<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** [Purpose] *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* (HCRV) can cause serious damage and is transmitted by *Taeniothrips eucharii*. The aim of this study was to provide the theoretical evidence for controlling HCRV. [Method] In this study, SYBR Green method of real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used, combined with the specific primers for HCRV *N* gene and  $\beta$ -*actin* gene of *T. eucharii* for quantitative analysis of HCRV content in different treatments. [Result] This method could accurately and specifically quantify the HCRV virus in *T. eucharii*. quantitative of HCRV RNA. The concentrate of HCRV was the lowest in 1<sup>st</sup> larvae. There was no statistical difference in 1<sup>st</sup> larva, 2<sup>nd</sup> larva and pupa. And the concentrate of HCRV was the highest in adults.

收稿日期: 2018-05-10

修回日期: 2018-11-25

网络首发时间: 2020-01-14 14:30:32

\*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471828, 31260451); 云南省科技厅重点项目 (2018FA019)。

作者简介: 吴家琦 (1991—), 男, 山东德州人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病理研究。

E-mail: 2488768823@qq.com

\*\*通信作者 Corresponding authors: 李永忠 (1969—), 男, 云南龙陵人, 博士, 教授, 主要从事烟草科学研究。E-mail: liyongzhong@163.com; 刘雅婷 (1971—), 女, 湖南祁东人, 博士, 教授, 主要从事植物病原微生物与寄主互作研究。E-mail: liuyating66@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200113.1723.005.html>



HCRV was growing gradually after the 1<sup>st</sup> larvae acquire HCRV. [ **Conclusion** ] This indicated that *T. eucharii* transmitted HCRV as a persistent-propagative manner.

**Keywords:** *Orthotospovirus*; *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* (HCRV); thrips *Taeniothrips eucharii*; transmission properties

正番茄斑萎病毒属 (*Orthotospovirus*) 病毒属于布尼亚病毒目 (Bunyavirales) 番茄斑萎病毒科 (Tospoviridae)<sup>[1]</sup>。正番茄斑萎病毒属病毒具有广泛的植物寄主范围, 而其传播介体——蓟马在全球重要的农业生产区域均有分布。2013 年, 朱顶红褪绿环斑病毒 (*Hippeastrum chlorotic ringspot virus*, HCRV) 首次在中国云南昆明被鉴定并报道<sup>[2]</sup>, 通过病毒粒子显微结构、基因组结构特点及寄主范围确定该病毒为一种新的正番茄斑萎病毒属病毒<sup>[2-4]</sup>。2013—2014 年, 本项目组首次报道了该病毒的 S 和 MRNA 序列<sup>[4]</sup>, 其 SRNA 序列长为 2 724 nt, 正向编码 444 aa 的 NSs 蛋白, 反向编码 275 aa 的核壳体蛋白。MRNA 序列长约 4 741 nt, 正向编码 309 aa 的非结构蛋白 NSm 及 GnGc, 反向编码 1 130 aa 的糖蛋白前体。该病毒能入侵朱顶红 (*Hippeastrum rutilum*)、蜘蛛兰 (*Hymenocallis littoralis*)、喜林芋 (*Philodendron bipinnatifidum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 等经济作物, 引起同心环纹、叶片畸形、坏死斑、坏死和环斑等症状, 严重危害农业生产。目前该病毒已广泛扩散至福建、广东、广西、海南和云南等中国南部省份<sup>[5]</sup>, 感染速度快、范围广, 危害极为严重。HCRV 主要由细角带蓟马 (*Taeniothrips eucharii*) 传播<sup>[2]</sup>。细角带蓟马 (*T. eucharii*) 是 1922 年在百慕大群岛 (北大西洋) 被记录, 后来在中国多次被报道<sup>[6-7]</sup>。目前关于细角带蓟马与 HCRV 的相关研究只局限在获毒率与传毒率方面。

目前关于 HCRV 在不同虫龄细角带蓟马中的增殖规律还不清楚, 本研究建立实时荧光 PCR 技术对饲毒后不同虫龄的细角带蓟马中的 HCRV 病

毒核酸含量进行相对定量分析, 旨在明确 HCRV 在细角带蓟马中的增殖情况, 将有助于深入明确 HCRV 与细角带蓟马的互作关系研究。

1 材料与方法

1.1 材料

使用的 HCRV 株系为 2012 年由本课题组分离并鉴定的 HCRV HLS1-2 株系, 接种于一点红 (*Emilia sonchifolia*)。细角带蓟马 (*T. eucharii*) 为 2013 年由本课题组鉴定并饲养的品系。

1.2 方法

1.2.1 样本准备

收集孵化后的 1 龄细角带蓟马若虫, 将 1 龄若虫置于感病的一点红叶片上获毒 48 h, 以保证绝大部分的若虫均获毒。将一部分的 1 龄若虫收集, 置于-80 ℃ 冰箱中保存, 将剩余的蓟马置于无毒的四季豆 (*Phaseolus vulgaris*) 和韭葱 (*Allium porrum*) 上, 恒温箱中饲养。分别收集发育至 2 龄若虫、蛹及成虫若干只, 置于-80 ℃ 冰箱中保存。提取单头蓟马 RNA, 并以随机引物进行逆转录, 每个处理 3 个重复, 以未获毒的细角带蓟马为阴性对照。

1.2.2 引物设计与合成

荧光定量过程中对于参照基因 *β-actin* 源于参考文献<sup>[8]</sup>, HCRV *N* 基因引物序列根据 NCBI 已经公布的 HCRV RNA 序列 (Accession No. JX833564) 设计 (表 1)。

1.2.3 质粒标准品制备

以 WFT-26F/WFT-92R、HQ1F/HQ1R 为引物, 扩增 *β-actin*、HCRV *N*, 连接 pEASY-T1 载体, 克隆转化测序筛选后, 对阳性克隆提取重组质粒

表 1 实时荧光定量引物  
Tab. 1 Primers for qRT-PCR

| 目的基因 gene                     | 引物名称 primers | 序列 (5'→3') sequence    | 片段大小/bp size |
|-------------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| <i>β-actin</i> <sup>[9]</sup> | WFT-26F      | GTATCGTCCTGGACTCTGGTGA | 130          |
|                               | WFT-92R      | GGAAGGCGCTAACCTTCATAG  |              |
| <i>N</i>                      | HQ1F         | AGGGTTTCATTAGAGCCA     | 110          |
|                               | HQ1R         | CATTGACCATAGGGAGGT     |              |

用于标准曲线的制备。凝胶电泳及分光光度计检测质粒纯度及浓度。对 2 种重组质粒进行 10 倍的连续梯度稀释, 获得  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  稀释梯度的质粒。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 方法的建立

本过程选用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 根据说明进行采用两步法反应程序。反应体系为 20  $\mu$ L: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ )10  $\mu$ L, PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, DNA 模板 (<100 ng) 2  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 6  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 后 95  $^{\circ}$ C 变性 3 s, 58  $^{\circ}$ C 退火与延伸 30 s, 进行 40 个循环。结束后进行溶解曲线检测。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 特异性

对  $\beta$ -actin 及 HCRV N 基因扩增后的特异性进行分析。Real-time PCR 结束后形成溶解曲线,

结果显示在针对  $\beta$ -actin 质粒标准品 (图 1) 定量试验的溶解曲线均只在  $T_m=82^{\circ}\text{C}$  处出现 1 条单一的峰, 且阴性对照未出现扩增片段。HCRV N 基因 (图 1) 质粒标准品定量试验的溶解曲线均只在  $T_m=79.5^{\circ}\text{C}$  处出现 1 条单一的峰, 且阴性对照未出现扩增片段。说明  $\beta$ -actin 及 HCRV N 基因引物进行定量特异性高, 结果可靠。

2.2 标准曲线建立

将含有  $\beta$ -actin 的阳性标准质粒 10 倍稀释液作为模板, 通过荧光定量 PCR 扩增。待反应结束以后, 通过软件自动分析荧光定量 PCR 反应结果。绘制  $\beta$ -actin 扩增曲线及标准曲线 (图 2), 标准曲线方程为:  $y=-3.403\ 2x+27.005$ , 扩增效率为 100.7%, 相关系数为 0.999 4, 标准质粒含量对数与  $C_t$  值之间有良好的线性关系。

将含有 HCRV N 基因的阳性标准质粒 10 倍稀释液作为模板, 通过荧光定量 PCR 扩增。待反应结束后, 软件自动分析荧光定量 PCR 反应结果。

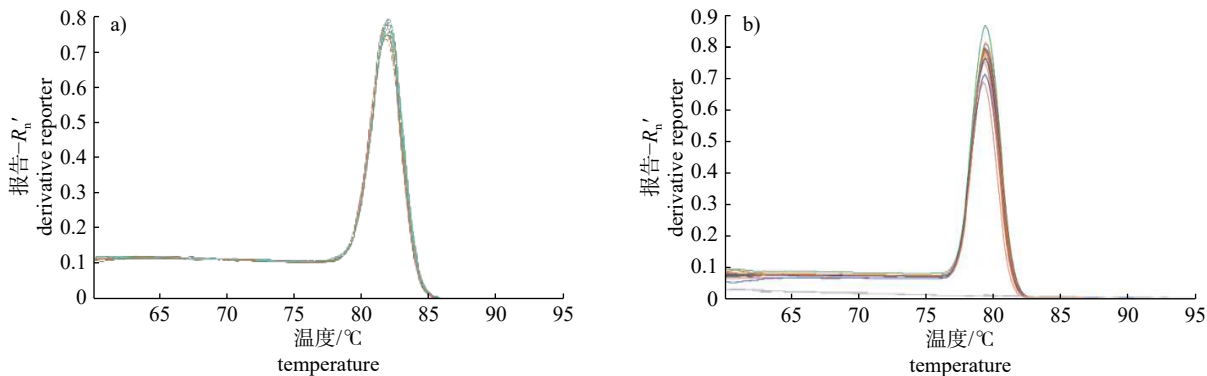


图 1  $\beta$ -actin (a) 和 N 基因 (b) 定量溶解曲线  
Fig. 1 Melt curve of  $\beta$ -actin (a) and N gene (b)

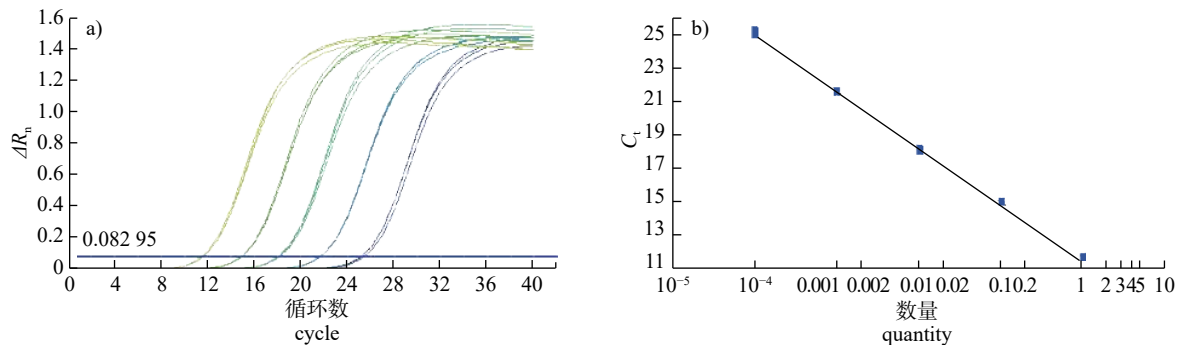
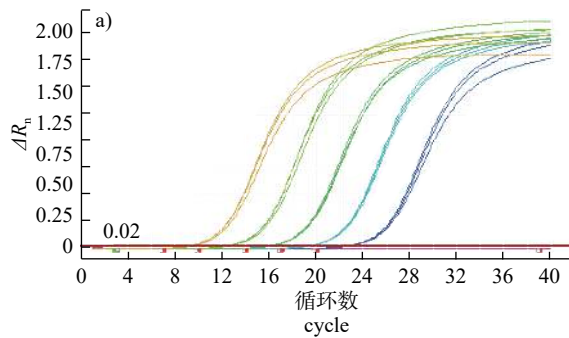


图 2  $\beta$ -actin 扩增曲线 (a) 及标准曲线 (b)  
Fig. 2 Amplification plot (a) and standard curve (b) of  $\beta$ -actin

绘制 HCRV *N* 基因扩增曲线及标准曲线 (图 3), 标准曲线方程为  $y = -3.403 2x + 27.005$ , 扩增效率



为 96.71%, 相关系数为  $R^2 = 0.999 8$ , 标准质粒浓度对数与  $C_t$  值之间有良好的线性关系。

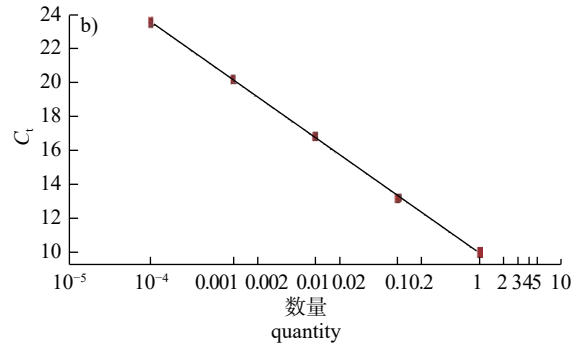


图 3 HCRV *N* 基因扩增曲线 (a) 及标准曲线 (b)

Fig. 3 Amplification plot (a) and standard curve (b) of *N* gene

### 2.3 对细角带蓟马获毒 HCRV 后不同虫龄病毒的相对量

通过对不同的处理进行实时荧光定量, 最终获得不同虫龄中 HCRV 相对量 (图 4)。去除异常值后, 应用 Scheffe 法验证不同虫龄间病毒含量差异, 应用双标准曲线法进行分析, 结果显示: 成虫与其他虫龄间的差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而 1 龄若虫、2 龄若虫及蛹的差异不显著。结果表明: HCRV 在蓟马发育过程中病毒粒子不断增加。1 龄若虫中 HCRV 核酸含量最低, 到达成虫时病毒核酸含量最高。说明 HCRV 在细角带蓟马发育过程中以增殖的形式传播。

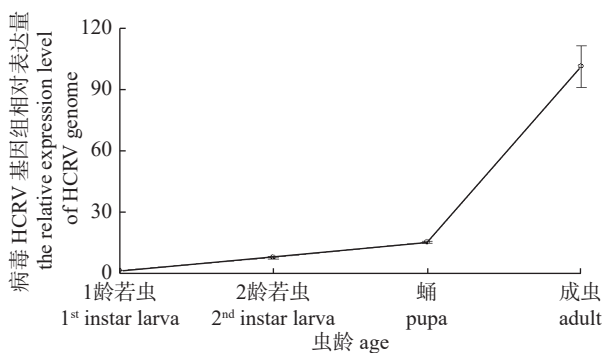


图 4 HCRV 在细角带蓟马发育过程中的增殖规律

Fig. 4 Multiplication rule of HCRV in different developing stages of *T. eucharii*

### 3 讨论

本研究首次构建了 HCRV 的 qRT-PCR 检测体系, 能够定量检测到单头蓟马体内 HCRV。所

用的 qRT-PCR 法是基于 SYBR Green 的, SYBR Green 是一种 DNA 染料, 能够与双链 DNA 结合产生荧光。在 PCR 过程中通过仪器检测反应体系中的荧光信号, 实现对 PCR 过程的实时监测。在研究中基于 *N* 基因和  $\beta$ -actin 设计特异性引物进行扩增, 避免了在扩增中非特异性条带的产生。在针对 *N* 基因和  $\beta$ -actin 扩增反应的熔解曲线可以看出其在 82 °C 处出现 1 个单峰, 且在温度上升过程中无杂峰出现, 说明所选择的引物特异性高。研究中选用基于双标准曲线法的相对定量比较细角带蓟马 4 个发育时期体内的 HCRV 核酸相对含量。选用的内参基因为  $\beta$ -actin,  $\beta$ -actin 在蓟马体内表达稳定, 被用于蓟马相关实时荧光定量 PCR 检测过程中的参照基因。双标准曲线法需要同时对目的基因和对照基因构建标准曲线, 然后通过标准曲线得出的回归方程算出初始模板量, 再经过均一化处理后得目的基因的相对含量。通常认为构建标准曲线时, 相关系数  $R^2 > 0.98$ , 扩增效率为 90%~110%, 其引物用于该反应的荧光定量检测结果较好。本试验中绘制  $\beta$ -actin 标准曲线, 扩增效率达到 100.07%, 相关系数  $R^2 = 0.999 4$ 。绘制 *N* 基因标准曲线, 扩增效率为 96.71%, 相关系数为  $R^2 = 0.999 8$ 。构建的标准曲线复合要求。熔解曲线与标准曲线均表明本试验中所选用的目的基因引物和对照基因引物均符合要求。

qRT-PCR 技术对获毒后不同虫龄体内病毒核酸含量进行了检测, 为准确分析 HCRV 在细角带蓟马发育过程中的增殖规律提供数据。HCRV 在细角带蓟马发育过程随着蓟马的发育而增加, 成虫中的病毒核酸含量最高。

正番茄斑萎病毒属病毒是植物病毒中少数以循环增值型方式传播的病毒。蓟马获毒后可以终生带毒, 而病毒在蓟马中的复制增殖提高了其传播效率。1999 年, NAGATA 等<sup>[9]</sup>的研究发现西花蓟马只有在若虫获毒, 成虫时期才能够传毒。若虫获毒后并不立即传播, 需要在西花蓟马体内增殖后才能够有效传播, 但不会通过卵传至后代<sup>[10]</sup>。西花蓟马若虫在取食感染正番茄斑萎病毒属病毒的植株后获毒, 携带病毒的成虫将病毒传播给其他植物。蓟马的刺吸式口器破坏正番茄斑萎病毒属病毒感染植物的组织后, 正番茄斑萎病毒属病毒粒子随着植物汁液到达若虫的中肠并且感染中肠细胞, 并被介体蓟马以循环增殖的方式传播。传毒蓟马在若虫时期食用获毒的叶片组织后, 病毒粒子进入蓟马的中肠并且感染中肠细胞<sup>[11-13]</sup>。研究表明: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) 的获毒最短时间发生在传毒蓟马取食后的 5 min<sup>[14-15]</sup>。病毒粒子扩散中肠周围的肌肉细胞, 随后病毒粒子在中肠中扩散<sup>[16]</sup>, 最后病毒可以在唾液腺组织中检测到<sup>[9, 17-18]</sup>。当获毒蓟马发育到最后一个若虫阶段时, 病毒粒子也可以在它的前肠 (foregut) 中检测到<sup>[19]</sup>。研究表明: 西花蓟马的获毒时期仅在 1 龄若虫及 2 龄若虫的前期<sup>[16]</sup>, 而且其他时期将不会获毒<sup>[11]</sup>。在 TSWV 传毒研究中发现病毒粒子的浓度与传毒过程密切相关<sup>[12, 18]</sup>。*Impatiens necrotic spot virus* (INSV) 在西花蓟马体内的增殖规律的研究同样表明: 随着西花蓟马的发育, INSV 在西花蓟马体内呈指数级扩增, 到成虫增加到  $10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$  则开始传播病毒, 但成虫体内的 INSV 病毒不传给子代。本试验通过实时荧光定量 PCR 技术, 应用相对定量方法, 以  $\beta\text{-actin}$  为对照基因, 对不同虫龄体内的 HCRV 病毒核酸含量进行相对定量分析。明确不同虫龄蓟马体内病毒核酸含量是逐步增加的。但是是否能够将病毒传给子代, 并没有在本研究中进行验证。

#### [ 参考文献 ]

- [1] OLIVER J E, WHITFIELD A E. The genus *Tospovirus*: emerging bunyaviruses that threaten food security[J]. Annual Review of Virology, 2016, 3(1): 101. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055036.
- [2] XU Y, GAO X, JIA Z Q, et al. Identification of *Taeniothrips euchariei* (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* in Southern China[J]. Plant Disease, 2017, 101(9): 1597. DOI: 10.1094/PDIS-01-17-0045-RE.
- [3] DONG J H, YIN Y Y, FANG Q, et al. A new tospovirus causing chlorotic ringspot on *Hippeastrum* sp. in China[J]. Virus Genes, 2013, 46(3): 567. DOI: 10.1007/s11262-012-0873-z.
- [4] CHEN X J, XU X G, LI Y Z, et al. Development of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of *Impatiens necrotic spot virus*[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 189(2): 299. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.02.012.
- [5] 高君直, 吴保为, 高雪, 等. 云南不同地区蜘蛛兰上朱顶红褪绿环斑病毒 RNA S 序列分析[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2017, 32(2): 218. DOI: 10.16211/j.issn.1004-390x(n).2017.02.005.
- [6] MOUND L A, TREE D J. The oriental lily-flower thrips *Taeniothrips euchariei* (Whetzel) (Thysanoptera: Thripidae) new to Australia[J]. Australian Entomologist, 2008, 35(4): 159.
- [7] VIERBERGEN G, KUCHARCZYK H, KIRK W D J. A key to the second instar larvae of the Thripidae of the Western Palaearctic region (Thysanoptera)[J]. Tijdschrift Voor Entomologie, 2010, 153(1): 99. DOI: 10.1163/22119434-900000294.
- [8] BOONHAM N, SMITH P, WALSH K, et al. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (*TaqMan*)[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 101(1/2): 37.
- [9] NAGATA T, INOUE-NAGATA A K, SMID H M, et al. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt tospovirus* [J]. Journal of General Virology, 1999, 80(2): 507. DOI: 10.1099/0022-1317-80-2-507.
- [10] WETERING F. *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission[J]. Phytopathology, 1996, 86(9): 900. DOI: 10.1094/phyto-86-900.
- [11] ULLMAN D, SHERWOOD J, GERMAN T, et al. Location and composition of cytoplasmic inclusions in thrips cells infected with *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)[J]. Phytopathology, 1993, 83(12): 1374.
- [12] ULLMAN D E, WESTCOT D M, CHENAULT K D, et al. Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of tomato spotted wilt tospovirus proteins in infected thrips cells[J]. Phytopathology, 1995, 85(6): 644. DOI: 10.1094/Phyto-85-644.
- [13] WIJIKAMP I, PETERS D. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay[J]. Phytopathology, 1993, 83(9): 986. DOI: 10.1094/Phyto-83-986.
- [14] RAZVYAZKINA G M. The importance of the tobacco thrips in the development of outbreaks of tip chlorosis of Makhorka[J]. Doklady Vsesoyuznoi Akadmi Sel'skokho-zyaistvennykh Nauk, 1953, 18: 27.

(下转第 61 页)