

# 当阳鱼腥草花叶病原分子鉴定

周洁<sup>1</sup>, 吴方华<sup>2</sup>, 燕飞<sup>3</sup>, 齐传东<sup>1</sup>, 郭凤领<sup>1</sup>, 吴金平<sup>1</sup>

(1. 湖北省农业科学院经济作物研究所·农业农村部高山蔬菜生态栽培重点实验室·湖北省蔬菜种质创新与遗传改良重点实验室 武汉 430064; 2. 湖北省当阳市两河镇农业服务中心 湖北宜昌 444114; 3. 宁波大学植物病毒学研究所 浙江宁波 315211)

**摘要:**明确当阳鱼腥草花叶病致病菌种类,为当阳鱼腥草花叶病的田间防治提供依据。采集鱼腥草花叶叶片提取当阳鱼腥草典型病样的总RNA,利用sRNA深度测序,结合生物信息学分析初步确定病原菌,利用该病毒外壳蛋白(CP)特异性引物进行RT-PCR检测,所得序列进行BLAST比对和系统进化树构建,以进一步确定病原菌种类。利用sRNA深度测序和生物信息学初步确定鱼腥草花叶病致病菌为黄瓜花叶病毒(CMV),特异性引物扩增得到878 bp特异性条带,经BLAST比对发现其与已发表的CMV序列高度同源,相似性最高达97.84%。通过CMV病毒CP基因的核苷酸序列构建系统进化树可得鱼腥草花叶病毒属于CMV亚组II。引起鱼腥草花叶病的病原属于黄瓜花叶病毒II亚组,研究结果为鱼腥草花叶病防治提供了理论基础。

**关键词:**鱼腥草; 黄瓜花叶病毒; sRNA深度测序; RT-PCR

中图分类号: S649

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)09-054-05

## Molecular identification of mosaic disease on *Houttuynia cordata* Thumb. in Dangyang

ZHOU Jie<sup>1</sup>, WU Fanghua<sup>2</sup>, YAN Fei<sup>3</sup>, QI Chuandong<sup>1</sup>, GUO Fengling<sup>1</sup>, WU Jinping<sup>1</sup>

(1. Institute of Economic Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Vegetable Ecological Cultivation on Highland, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Hubei Key Laboratory of Vegetable Germplasm Enhancement and Genetic Improvement, Wuhan 430064, Hubei, China; 2. Agricultural Service Center of Lianghe Town, Dangyang City, Yichang 444114, Hubei, China; 3. Institute of Plant Virology, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

**Abstract:** The identification of pathogenic bacteria species causing *Houttuynia cordata* mosaic disease in Dangyang will provide a theory basis for the field control of the disease. The mosaic leaves of *Houttuynia cordata* were collected to extract the total RNA of typical mosaic disease samples, and sRNA deep sequencing was conducted. Based on bioinformatics analysis, the pathogen was initially identified. Using the virus coat protein(CP) specific primers for RT-PCR detection, the obtained sequences were subjected to BLAST alignment and a phylogenetic tree construction to further identify the pathogen. Using sRNA deep sequencing and bioinformatics analysis, it was initially determined that the causative virus of *Houttuynia cordata* mosaic disease was cucumber mosaic virus(CMV). Specific primers amplified a specific band of 878 bp, which was found to be highly homologous to published CMV sequences through BLAST alignment, with a similarity of 97.84%. By constructing a phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of CMV virus CP gene, it can be concluded that *Houttuynia* mosaic virus belongs to subgroup II of CMV. This result provides a theoretical basis for the prevention and treatment of *Houttuynia cordata* mosaic disease.

**Key words:** *Houttuynia cordata*; Cucumber mosaic virus; sRNA sequencing; RT-PCR

收稿日期: 2023-12-28; 修回日期: 2024-04-17

基金项目: 湖北省农业科技创新中心项目(2021-620-000-001-007); 国家特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-G-17)

作者简介: 周洁, 女, 助理研究员, 主要从事特色蔬菜资源挖掘与利用工作。E-mail: 384881257@qq.com

吴方华, 男, 正高级农艺师, 主要从事鱼腥草、大蒜等特色蔬菜栽培技术研究与应用。E-mail: 2683028688@qq.com

通信作者: 郭凤领, 女, 研究员, 主要从事特色蔬菜资源挖掘与利用工作。E-mail: 444769935@qq.com

吴金平, 女, 研究员, 主要从事特色蔬菜资源挖掘与利用工作。E-mail: 274184394@qq.com

鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)又名折耳根,是三白草科蕺菜属多年生草本植物,其含有多酚、多糖、甾醇类和黄酮类化合物等<sup>[1]</sup>,具有清热解毒等功效,是我国传统的药食两用植物<sup>[2]</sup>。随着生活水平的不断提高,人们对健康食品的追求也逐步提升,鱼腥草作为一种健康蔬菜也随之进入市场,因此单靠采集野生鱼腥草已不能满足市场需求。据湖北宜昌当阳两河镇农业服务中心统计,当阳两河镇1998年开始试种鱼腥草,到2023年种植面积已超过1400 hm<sup>2</sup>,年产量8.8万t,全产业链产值达到18.88亿元,是中国蔬菜流通协会授予的全国首个“中国鱼腥草之乡”。

目前,关于鱼腥草药用价值方面的研究较多。已有研究发现,其所含鱼腥草素具有抗炎和抗病毒的功效<sup>[3]</sup>,黄酮类物质具有祛痰止咳等功效<sup>[4]</sup>。此外,鱼腥草提取液对南瓜白粉病也具有一定的防治效果<sup>[5]</sup>。关于鱼腥草种植过程中的病害鉴定及防控多为白绢病、炭疽病等真菌病害的报道<sup>[6-7]</sup>。由于鱼腥草利用根茎无性繁殖导致病害增多<sup>[8]</sup>,加上集约化种植,近年来鱼腥草花叶病在当阳市两河镇呈现明显的加重趋势,据当阳市两河镇农技推广中心调查数据,2021年间严重的田块发生率在70%以上,给当地鱼腥草种植业造成不良影响。目前,国内关于鱼腥草病毒病的研究较少,湖北省农业科学院经济作物研究所特色蔬菜课题组在对两河镇鱼腥草种植基地调查的过程中发现,该病的田间症状主要表现为部分叶片深绿色斑驳,叶片变厚,叶脉深绿。笔者拟通过sRNA高通量测序和RT-PCR技术对当阳鱼腥草花叶病原进行鉴定,明确该病害致病菌类型,以为鱼腥草田间病毒病的防控提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2021年3—4月于当阳市两河镇鱼腥草示范基地随机采集具有典型花叶病症的叶片9份和健康的鱼腥草叶片1份,每份10片叶子,共累积10份样品保存备用,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存。

分子生物学试剂盒:总RNA提取利用RNA提取试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, USA),反转录利用全式金TransScript® II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒,DNA纯化回收利用全式金琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒。

### 1.2 方法

1.2.1 鱼腥草总RNA的提取和测序 将准备的叶片样品(10份)分别在液氮中充分研磨,参照Trizol试剂RNA提取试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, USA)说明书步骤提取各个样品的总RNA,其中9份病样总RNA由诺禾致源生物科技有限公司进行sRNA深度测序,在Illumina NovaSeq 6000平台上以PE150 bp进行高通量测序,采用CLC Genomic Workbench 11以默认参数(QIAGEN, Hilden, Germany)进行数据分析。

1.2.2 鱼腥草花叶病毒的RT-PCR检测 根据深度测序后的比对结果设计引物,用于RT-PCR检测和验证sRNA测序结果,以健康的鱼腥草叶片作为阴性对照,选取1号鱼腥草花叶病样进行RT-PCR检测。以总RNA为模板,参照全式金TransScript® II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒操作说明逆转录合成第一链cDNA,作为PCR扩增的模板。PCR引物为黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV) CP基因通用检测引物(CMVCPuF 5'-TCTCATG-GATG CTTCTCCGCG-3', CMVCPuR 5'-CCGTA-AGCTGGACAACC-3')<sup>[9]</sup>。PCR反应体系为10 μL, cDNA模板1 μL,上下游引物各0.2 μL, Green Tap Mix 5 μL,加ddH<sub>2</sub>O 3.6 μL。循环体系为94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,35个循环;72℃延伸10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测并参照全式金琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒说明书对目标产物进行回收纯化,送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测序,测序结果在NCBI核酸数据库内进行BLAST比对。

1.2.3 系统发育分析 利用MEGA 7.0软件对扩增得到的CMV CP基因序列构建系统进化树,采用邻接法(Neighbor-joining),分支置信度(bootstrap)设置为1000构建进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 鱼腥草花叶病田间症状

当阳市两河镇鱼腥草示范基地中鱼腥草花叶病的症状主要表现为叶片褪绿黄化斑驳、叶脉黑褐色,主要集中在叶片边缘,严重时扩展至整片叶片,部分叶片厚度增加或呈现点状或条状坏死,部分叶片萎黄,整株没有明显矮化现象(图1)。



图1 鱼腥草病毒病田间症状  
Fig. 1 Field symptoms of *Houttuynia* virus disease

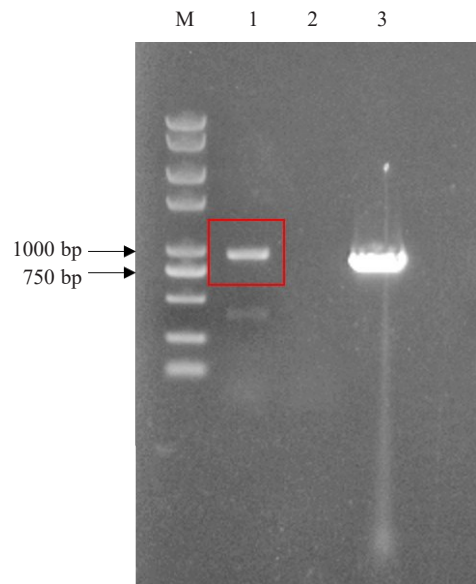
### 2.2 鱼腥草花叶病的sRNA深度测序

为鉴定鱼腥草上可能存在的病原,选取表现典型症状的鱼腥草植株进行高通量测序,共得到总计 32 126 252 条原始数据 (reads),采用 Blastn 或 Blastx 与 GenBank 登录序列进行比对分析,得到 110 501 条拼接序列 (contigs),这些拼接序列的长度范围在 15~18 773 bp,进一步将这些序列与目前已登录的所有病毒序列进行比对,仅比对到 3 个病毒相关的拼接序列,长度分别是 3427、3282、2461 bp,经 Blastn 序列比对分别匹配到黄瓜花叶病毒的 RNA1 (KX883818)、RNA2 (KX883817) 和 RNA3 (EU665002)。根据以上结果,初步判断引起鱼腥草花叶病的病毒为黄瓜花叶病毒。

### 2.3 鱼腥草花叶病毒的RT-PCR检测

为了验证 sRNA 测序分析的结果,利用特异性引物对 CMV 的 CP 基因序列进行测序分析,以健康无病的鱼腥草叶片为阴性对照,以 CMV 病毒为阳性对照。结果显示,1 号鱼腥草样品中扩增得到大小为 878 bp 的片段,阳性对照也可得到该片段,而健康鱼腥草叶片样品中并未得到该目标条带(图 2)。

将所得序列进行 BLAST 比对,发现该序列与报道的 50 个 CMV 分离物 CP 基因序列核苷酸序列相似性为 96.71%~97.84%。其中与 CMV 杭州番茄分离物的核苷酸序列 (GenBank 登录号: DQ249298.1)相似性最高,达到 97.84%,说明鱼腥草花叶病样品中分离得到的病毒为 CMV 病毒。将得到的鱼腥草花叶病病毒命名为 CMV-YXC,选取 GenBank 中具有代表性的 CMV 病毒 CP 基因的核



注:M. Marker; 1. 1 号鱼腥草花叶病样; 2. 健康的鱼腥草叶片样品; 3. 黄瓜花叶病毒。

Note: M. Marker; 1. Sample of *Houttuynia* mosaic disease; 2. Sample of healthy *Houttuynia* leaves; 3. Cucumber mosaic virus.

图2 不同样品的 PCR 扩增结果  
Fig. 2 The results of PCR amplification of different samples

苷酸序列构建系统进化树(图 3)。结果显示,鱼腥草中分离的 CMV 病毒的 CP 基因序列与 CMV II 亚组的代表菌株日本西红柿 (GenBank 登录号: AB176847.1) 及中国西红柿分离物 (GenBank 登录号: DQ249298.1)、韩国甘露子分离物 (GenBank 登录号: LC487909.1) 和中国万寿菊分离物 (GenBank 登录号: EU665002.1) 等分布在进化树同一分支。



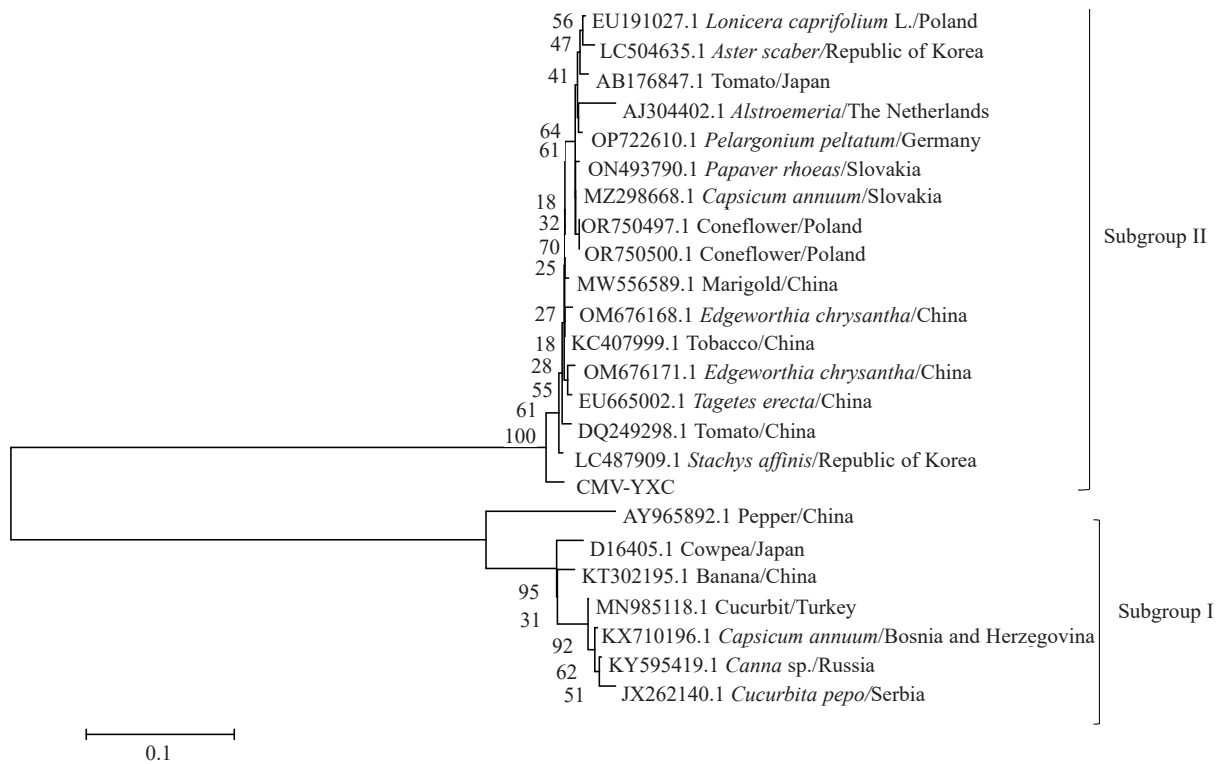


图3 基于CMV CP基因的核苷酸序列的系统进化树  
 Fig. 3 Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of CMV CP gene

### 3 讨论与结论

当阳市两河镇是我国首个“鱼腥草之乡”，随着鱼腥草种植规模的不断扩大，以根茎无性繁殖为主的鱼腥草种植模式导致的种源带菌问题也日益凸显，尤其是鱼腥草花叶病的发生越来越严重，对鱼腥草嫩茎叶的采收和地下茎的生长均造成较大影响，给鱼腥草产业的健康发展造成一定阻碍。

sRNA 深度测序能够在病毒浓度较低的情况下对植物组织中的病毒种类进行鉴定，相比常规的病毒检测方法，sRNA 深度测序技术具有适用性强、灵敏度高和获取信息丰富的特点<sup>[10]</sup>。笔者通过对两河镇鱼腥草花叶病样的采集，结合 sRNA 深度测序和 RT-PCR 检测分析，结果表明当阳市鱼腥草花叶病的病原为 CMV 病毒。

目前，黄瓜花叶病毒 CMV 是已知寄主最多、分布最广、危害性最大的植物病毒之一，是雀麦花叶病毒科黄瓜花叶病毒属的代表种，可侵染 1000 多种双子叶植物和单子叶植物，是禾谷类作物、牧草、木本和草本观赏植物、蔬菜及果树上发生最广、危害最大的病毒。在新疆喀什地区，该病毒和辣椒轻斑病毒 PMMoV 可复合侵染引起辣椒病毒病<sup>[11]</sup>，河南洛阳地区辣椒、菜豆、花生和番茄上均发现了

该病毒<sup>[12]</sup>。CMV 病毒根据寄主类型、致病性和外壳蛋白序列等分为 CMV I 和 CMV II 亚组<sup>[13]</sup>，2 个亚组在我国均已有报道，但 CMV I 发生概率远高于 CMV II<sup>[12]</sup>，如首次在山西鹅绒藤上发现的花叶病毒经鉴定属于 CMV I 中的成员<sup>[14]</sup>，在云南茉莉花上分离的 CMV-YYJMLH 属于亚组 I 中的 IB 亚组，与 CMV 云南辣椒分离物亲缘关系最近<sup>[15]</sup>。而此次引起鱼腥草花叶病的黄瓜花叶病毒经分析属于 CMV II，与中国和日本西红柿上的分离物等亲缘关系较近，并未鉴定得到 CMV I。由此可见，目前当阳地区侵染鱼腥草引起花叶病的病毒主要为黄瓜花叶病毒 CMV II，由于 CMV I 的危害性和发生概率高于 CMV II<sup>[6]</sup>，因此有必要继续扩大当地鱼腥草病毒病的检测范围和数量，做好当阳鱼腥草示范基地的 CMV 监测工作。

黄瓜花叶病毒在田间主要是通过蚜虫、种子及汁液传播<sup>[17]</sup>，而鱼腥草以根茎无性繁殖为主，生产中建议预防为主，使用防虫网，避免蚜虫传毒；同时培养壮苗，适期定植；合理施用有机肥，采用配方施肥技巧，加强管理。在发病早期，喷洒 24%混脂酸·铜水剂 700~800 倍液，或 30%壬基酚磺酸铜水乳剂 600 倍液、2%宁南霉素水剂 500 倍液、0.5%菇类卵白多糖水剂 300 倍液，或 1.5%植病灵 II 号乳剂 1000

倍液、10%混杂脂肪酸铜水剂 100 倍液等。为保障鱼腥草产业的健康发展,在生产上加强对鱼腥草蚜虫等虫害防控、减少田间农事操作对植株的损伤,同时加强鱼腥草种苗病毒检测,做好抗病品种筛选鉴定,利用组织培养等技术进行脱毒种苗生产相关研究,结合病毒防控和抗病无病种苗研发等多方面保障鱼腥草产业的绿色可持续发展。

综上所述,笔者的研究首次证实了鱼腥草花叶病的病原属于 CMV 亚组 II,同时有必要对该病的发生做好监测工作,通过病毒防控和抗病种苗研发为鱼腥草产业健康发展提供技术保障。

### 参考文献

- [1] YANG L, JIANG J G. Bioactive components and functional properties of *Hottuynia cordata* and its applications[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2009, 47(12): 1154-1161.
- [2] 刘敏, 蒋跃平, 刘韶. 鱼腥草中生物碱类化学成分及其生物活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(1): 141-145.
- [3] 陆晓珊, 林也, 唐琳, 等. 鱼腥草的化学成分与安全性研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(3): 144-147.
- [4] 赵强, 杨洁, 赵三虎, 等. 鱼腥草总黄酮提取及其药理作用研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(23): 7918-7923.
- [5] 李发康, 李培, 李兴昱, 等. 5 种中草药提取液对裸仁美洲南瓜白粉病的防治效果[J]. *中国蔬菜*, 2020(3): 56-60.
- [6] 魏林, 梁志怀, 陈玉荣, 等. *Trichoderma harzianum* TUV-13 对鱼腥草白绢病的防治及其促生长作用[J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28(3): 381-386.
- [7] 周洁, 吴金平, 王明安, 等. 鱼腥草炭疽病病原鉴定及室内药剂筛选[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(10): 2919-2927.
- [8] 吕茹婧, 郑露, 黄俊斌. 鱼腥草叶斑病病原鉴定[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 中国农业科学技术出版社, 2009.
- [9] LI Y Y, MA Y, MENG Y, et al. First report of chilli vein mottle virus infecting *Solanum aethiopicum* in China[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(6): 1181.
- [10] 谢慧婷, 李战彪, 崔丽贤, 等. 广西局地西番莲病毒病的病原鉴定及优势病毒分析[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(4): 387-393.
- [11] 柴阿丽, 陈利达, 许帅, 等. 新疆喀什辣椒轻斑病毒和黄瓜花叶病毒复合侵染的分子鉴定[J]. *华北农学报*, 2020, 35(增刊 1): 332-337.
- [12] 李月月, 王前进, 田珊, 等. 黄瓜花叶病毒在洛阳地区的发生及亚组鉴定[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(7): 114-120.
- [13] 陈玉珍, 谭新球, 朱春晖, 等. 我国部分地区常见农作物上黄瓜花叶病毒分离物核酸多样性分析[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(3): 427-433.
- [14] 杜江, 马振男, 王德富, 等. 基于小 RNA 深度测序和 RT-PCR 鉴定鹅绒藤花叶病的病毒病原[J/OL]. *草业科学*, 1-13[2023-03-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1069.s.20231109.1617.004>.
- [15] 张天毅, 余代宏, 曹玉莲, 等. 云南茉莉花病毒种类初步鉴定及 CMV 茉莉花分离物 CP 基因序列分析[J/OL]. *植物病理学报*, 1-14[2024-01-08]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001343>.
- [16] 申莉莉, 宋丽云, 龚明月, 等. 烟草黄瓜花叶病毒亚组 I 分离物生物学特性[J]. *中国烟草科学*, 2021, 42(6): 30-35.
- [17] 王达新, 郭刚, 殷晓敏, 等. 黄瓜花叶病毒研究进展[J]. *现代农业科技*, 2013(3): 121-123.