

云、川、渝三七病毒病病原种类检测及多样性分析

郑天锐¹, 彭期定¹, 杨道勇¹, 董家红², 吴永杰¹, 席德慧¹

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 云南中医药大学中药学院 云南省南方药材资源重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 为了探明云、川、渝各地三七园区的病毒病发生情况、发生规律及病毒多样性, 利用逆转录聚合酶链式扩增反应技术 (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)/PCR 技术对田间采集的疑似病样进行了检测. 结果表明病毒病在各地三七园区均有发生, 病毒的检出率呈现逐年上升的趋势. 其中 CMV 的阳性检出率为 51.04%, PnVA 阳性检出率为 63.54%, 两种病毒复合侵染率为 32.29%. 将获得的黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 和三七 A 病毒 (panax notoginseng virus A, PnVA) 的外壳蛋白基因 (coat protein, CP) 序列进行了序列比对及系统进化分析. 结果表明各地病毒分离物的 CP 基因均存在差异.

关键词: 三七; 黄瓜花叶病毒; 三七 A 病毒; 外壳蛋白基因; 多样性分析

中图分类号: S432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.056004

Detection and diversity analysis of viruses infecting *Panax notoginseng* in Yunnan province, Sichuan province and Chongqing municipality

ZHENG Tian-Rui¹, PENG Qi-Ding¹, YANG Dao-Yong¹,
DONG Jia-Hong², WU Yong-Jie¹, XI De-Hui¹

(1. Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. School of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Resource,
Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: To investigate the occurrence of viral diseases, the outbreak regularity and virus diversity in *Panax notoginseng* planting areas in Yunnan province, Sichuan province, and Chongqing municipality, the suspected disease samples collected in the fields were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) / PCR. The results showed that viral diseases occurred in all *Panax notoginseng* planting areas, and the detection rate of the virus showed an upward trend year by year. Among them, the positive detection rate of CMV and PnVA was 51.04% and 63.54%, respectively, and the combined infection rate of the two viruses was 32.29%. Then, the sequence alignment and phylogenetic analysis of coat protein gene (CP) of cucumber mosaic virus (CMV) and panax notoginseng virus A (PnVA) were carried out. The results showed that there were differences in the CP gene of virus isolates from different *Panax notoginseng* planting areas.

Keywords: *Panax notoginseng*; Cucumber mosaic virus; *Panax notoginseng* virus A; Coat protein gene; Diversity analysis

收稿日期: 2022-02-15

基金项目: 四川省中医药管理局中医药专项(2021MS522); 国家自然科学基金(32070167, 31772131); 中央高校基本科研业务费(2022SCUH0006)

作者简介: 郑天锐(1994-), 男, 云南宣威人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学. E-mail: zhengtr@stu.scu.edu.cn

通讯作者: 席德慧. E-mail: xidh@scu.edu.cn

1 引言

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 多年生林下经济草本植物, 是我国著名的传统中药材。以三七的根、根状茎入药, 在抗血栓、抗高血压、保肝、活血化瘀等方面具有显著疗效^[1]。同时三七也是云贵高原平衡生态重要的经济作物和云南生物药业及健康产业的标志性品种^[2], 在云南文山地区的经济发展中起着重要作用。云南省文山州作为三七的原产地和全国主产区, 产量(占全国三七产量的 90%) 和质量(外观质量和内在质量) 均居全国第一^[3]。但受三七连作障碍的影响, 三七的种植面积逐渐扩大到省内其他地区和部分省外地区。近年来, 在四川、重庆 200~600 m 的低海拔浅丘地带种植三七面积的已超过 70 hm²。

目前人工种植三七以免耕荫蔽的栽培方式进行规模化、精细化种植。在这样的农作系统下, 相较于野生种, 病虫害发生和扩散更加容易和普遍, 病害和虫害严重影响三七的根系生长和结实率, 进而影响三七的产量。有研究表明, 病毒感染三七后, 导致三七的产量和质量降低, 主要表现在株高、茎粗、中叶长等生物学性状降低、单株鲜重减少和三七总皂苷的含量降低^[4]。为控制病害的发生, 一度不合理的施用农药, 导致农药残留等问题严重影响三七产业的健康发展^[5], 另外由于缺乏对三七上病毒病的全面了解, 对病毒病的防治效果极差。对于四川、重庆等低海拔地区的三七种植能否摆脱病毒病的危害以及这些地区的病毒发生情况与云南主产区是否相同, 各地侵染三七的病毒分离物是否具有相似性或相关性等问题尚不清楚。这些问题正是目前甚至以后很长一段时间, 三七病毒病防治亟需解决的基本问题。

三七被病毒侵染后的症状多种多样, 常见的有白化、黄化、花叶、皱缩、麻点、驴耳、丛顶等症状^[6]。王勇等^[7]首次报道三七病毒病, 并将其分为皱缩、白化和花叶 3 种症状, 病原为有蕊线的线状病毒和球状病毒。在后续的研究中相继发现了病毒侵染三七的情况, 而且三七病毒病越来越严重^[8-10]。宋丽敏^[11]首次在蕨叶、皱缩的三七上用 RT-PCR 法检测到番茄花叶病毒 (tomato mosaic virus, ToMV); 陈燕芳等^[12]发现三七病毒病样中可能有多种病毒或株系侵染; 金羽^[9]用血清学方法和分子生物学方法在皱缩、白绿、花叶的三七中检测到

CMV, 为 CMV 侵染三七的首次报道, 但在后续的研究中未在三七病样上检测到 CMV; 张永江等^[13]在三七病样中检测到弱阳性的马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 病毒。杨建忠等^[14]在麻点型症状的三七上检测到番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV); Yan 等^[15]用 RT-PCR 技术从黄化、花叶、皱缩等症状的三七上检测到三七 Y 病毒 (panax virus Y, PnVY); 随后李梅蓉等^[16]对云南文山地区三七上获得 11 个三七 Y 病毒的 CP 基因进行分析; Li 等^[17, 18]用 PCR 技术在白化、皱缩、花叶及复合症状的三七病叶中检测到一种 DNA 病毒: 中国番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV) 及其卫星 (satellite); Guo 等^[19]在表现花叶症状的三七上检测到一种新病毒, 命名为三七 A 病毒 (PnVA); 杨馨等^[20]在三七病叶上检测到烟草扭脉病毒 (tobacco vein distorting virus, TVDV)。可见, 以往对于三七病毒病的研究主要还在病毒检测层面, 对各地病毒发生的多样性和发生规律鲜有研究。

2003 和 2005 年, 宋丽敏^[11]、金羽^[9]分别在三七上检测到 ToMV 和 CMV, 但在后续的研究中再未检测到这两种病毒。由此可见, 三七上病毒病的发生情况会随着时间和地点的变化而变化。迄今为止, 三七病毒病仍有很多未知的病原, 各地的发生情况也不尽相同。以往的研究主要针对云南主产区三七病毒病的发生情况, 而对除云南以外三七种植地区, 如重庆、四川等新兴低海拔浅丘地带三七种植区三七上病毒病的发生情况以及各地侵染三七的病毒是否具有相似性尚不清楚。

本研究采用田间调查法对云南、四川、重庆的部分三七种植基地病毒病发生情况进行调查。对采集的三七病样利用 PCR 和 RT-PCR 技术进行病毒检测, 并对各地分离得到的病毒进行多样性进行分析, 探索云南、四川、重庆三七病毒病的发生情况和发生规律, 以期为三七引种栽培和病毒病的防控提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2019 年至 2021 年分别到云南, 四川, 重庆七个三七种植基地进行病样调查, 采集三七病样 96 份, 记录病样采集时间、地点和各地采集样本数。每次采样后, 进行拍照分类, 带回实验室, 液氮速冻后, 冻存于 -80 °C 冰箱, 以备后续检测。

2.2 方 法

2.2.1 引物设计与合成 参照前人报道的引物序列合成检测三七病毒的引物;根据 Wu 等^[21]报道的肌动蛋白 ACT2 序列(登录号 KF815706)设计三七的内参基因引物 PnACT2 (Forward: AC-

CACTGAACCCAAAGGCTAAT ;Reverse: CCAATC AATGATGGCTGGAATA);根据 NCBI 上面报道的 PnVA 的全长序列(登录号 KT388111)设计扩增 PnVA CP 的引物. 引物由成都擎科生物科技有限公司合成. 引物序列和退火温度见表 1.

表 1 用于三七病毒检测的引物
Tab. 1 Primers used for viruses detection in *Panax notoginseng*

引物名称	引物序列(5'-3')	病毒名称	退火温度/℃	参考文献
Potyvirus-NIb-2F	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA	Potyvirus	45	[21]
Potyvirus-NIb-3R	TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC			
Tospovirus-F	CCTTTAACAGTDGAAACAT	Tospovirus	55	[22]
Tospovirus-R	TCATCRGARTGBACMATCCATCT			
ChiVMV-CP-F	CCGGAATTCATGGCAGGAGAGAGTGTG	ChiVMV	55	[23]
ChiVMV-CP-R	CGCGGATCCTCATAATCCCGAACGCC			
Begomovirus-PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC	TYLCCNV	50	[24]
Begomovirus-PB	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA			
PnVY-F	GCCAACCCTGATGGACGTA	PnVY	50	[18]
PnVY-R	AAATCTGCGCTCTTTGATGG			
TVDV-CP-R	GCAACAGCGAGACTTTCATCT	TVDV	55	[18]
TVDV-CP-R	CRTTGCCTTTATAGAGCAGCC			
CMV-CP-F	ATGGACAAATCTGRATCWMCC	CMV	55	[18]
CMV-CP-R	CTGGATGGACAACCCGTTCT			
PnVA-RdRp-F	AAGTATGAGTGGGCAAAGCAGC	PnVA	55	[18]
PnVA-RdRp-R	CGCGTGCATTAATCCTAGCCAT			
Tobamovirus-F	ATGAAGCCGAGACGTCGGTC	Tobamovirus	55	[18]
Tobamovirus-R	CGTGCCTACGCACATATATGA			
PnVA-CP-F	TCACCCCTTTCTAACAAAC	PnVA-CP	55	本研究
PnVA-CP-R	GACGGGGTCTGCATTAAATA			

R:A 或 G;W:A,T 或 U;M:A 或 C

2.2.2 核酸提取、PCR 及 RT-PCR 总 RNA 提取用 TransZol Plant Kit(购自北京全式金生物技术股份有限公司),DNA 提取用 CTAB^[18]提取法. DNA 病毒 TYLCCNV,以 DNA 为模板进行扩增检测. RNA 病毒先用总 RNA 逆转录合成 cDNA^[25, 26]再以 cDNA 为模板进行内参基因(PnACT2)扩增检测,确定反转录成功后再以 cDNA 为模板进行 PCR 检测,PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,合适的温度退火 30 s(表 1),72 ℃ 延伸(延伸时间以 1 min/kb 计算),34 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min. 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳,检测有无阳性条带,并记录、统计.

2.2.3 克隆及序列分析 将检测到病毒的样本,用其对应病毒的 CP 引物进行扩增,将 CP 基因的 PCR 产物用微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(购自上海生工生物工程股份有限公司)参照说明书进行回收. 回收产物连接至 pMD19-T Vector(购自大连 TaKaRa 公司),大于 2 kb 的片段需在 16 ℃ 环境下过夜连接. 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(购自成都擎科生物科技有限公司),37 ℃ 过夜培养后,挑选单菌落,加入到含有氨苄青霉素的 luria-bertani (LB) 培养基 37 ℃ 震荡培养后,进行菌液 PCR 验证,挑选阳性克隆送至成都擎

科生物科技有限公司进行测序. 利用生物学软件 DNAMAN 进行序列比对, 去除多余的载体序列 (较长的片段需要进行分段测序后进行拼接). 利用 DNASTar(Lasergene. v 7. 1) 中的 Megalign 工具进行核苷酸序列一致性比较. 用 MEGA-X 软件中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树(Bootstrap 重复次数为 1000).

3 结果与分析

3.1 三七病样采集和病毒病症状

三省(直辖市)共采集样本 96 份, 每个三七种

植区采集样本 8 株及以上(云南省曲靖市富源县, 2019 年、2020 年前后采样共 14 株). 三七病样采集地区南至云南省红河州建水县(23. 87° N, 103. 04° E), 北至四川省南充市阆中市(30. 71° N, 105. 33° E). 海拔最低点重庆市荣昌区(280 m), 海拔最高点云南省曲靖市富源县(2060 m), 四川、重庆的三七种植区的海拔均在 500 m 以下(表 2). 三七病毒病疑似样本主要表现为皱缩, 花叶, 丛顶, 白化, 麻点, 驴耳, 蕨叶, 黄化, 斑驳等症状(表 2, 图 1).

表 2 2019—2021 年三七田间病毒病调查

Tab. 2 Virus disease survey of *Panax notoginseng* in the field from 2019 to 2021

日期	采样地点	经纬度	海拔/m	苗龄/年	症状	数量/株
2019-07-08	云南省富源县	25. 88° N, 104. 30° E	2060 m	1	皱缩、麻点、花叶	4
2019-08-08	云南省丘北县	23. 88° N, 104. 10° E	1650 m	3	花叶, 黄化	8
2019-08-09	云南省建水县	23. 87° N, 103. 04° E	1340 m	3	黄化、皱缩、斑驳、花叶	8
				1	斑驳	2
2020-06-02	云南省富源县	25. 88° N, 104. 30° E	2060 m	3	丛顶、花叶、斑驳、皱缩	10
2020-07-19	四川省射洪市	30. 71° N, 105. 33° E	420 m	3	黄化、白化、花叶、皱缩	10
				1	黄化、皱缩	5
2021-08-19	四川省阆中市	31. 63° N, 106. 02° E	370 m	2	黄化、花叶、皱缩、麻点	13
2021-08-24	四川省乐至县	30. 39° N, 105. 04° E	440 m	2	花叶、皱缩、斑驳、麻点	26
2021-08-30	重庆市荣昌区	29. 38° N, 105. 56° E	280 m	3	黄化、皱缩、麻点、蕨叶	10

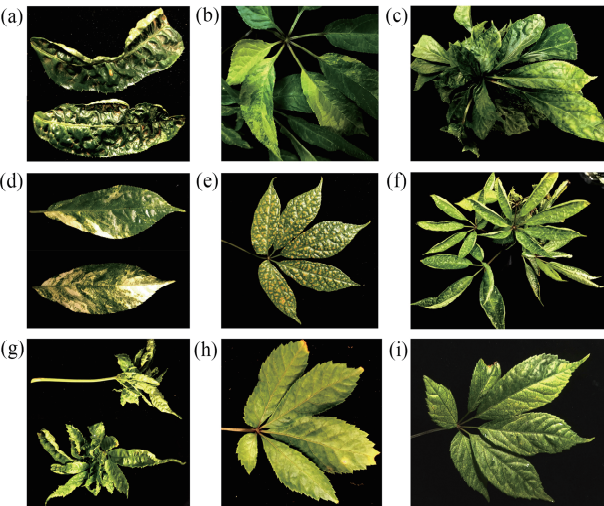


图 1 三七病毒病害田间症状

(a) 皱缩; (b) 花叶; (c) 丛顶; (d) 白化; (e) 麻点; (f) 驴耳; (g) 蕨叶; (h) 黄化; (i) 斑驳
Fig. 1 Symptoms of *Panax notoginseng* virus diseases in field

3.2 侵染三七的病毒种类鉴定

我们首先检测了马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*) 的病毒: PnVY 和辣椒脉斑驳病毒(chilli veinal mottle virus, ChiVMV), 两种病毒均未检测到. 我们猜测三七上可能存在 *Potyvirus* 属的其他病毒, 于是用 *Potyvirus* 属通用引物(Potyvirus-NIb-2F, Potyvirus-NIb-3R) 进行扩增检测, 均未检测到阳性样本. 说明所采集的样本中没有 *Potyvirus* 属病毒. 用引物检测了番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*) 病毒、双生病毒(*Begomovirus*), 烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*) 病毒, TVDV, CMV, PnVA. 其中用 CMV- CP 的引物扩增后, 检测到 760 bp 左右大小的条带(图 2a); 利用 PnVA-RdRp 的引物扩增后, 检测到 570 bp 左右大小的条带(图 2b), 在此基础上利用 PnVA-CP 的引物进行扩增, 同样能检测到 2380 bp 左右大小的条带(图 2c). 以上 RT-PCR 扩增产物经测序比对后, 验证确实为 CMV 和 PnVA, 且在各地均有发生.

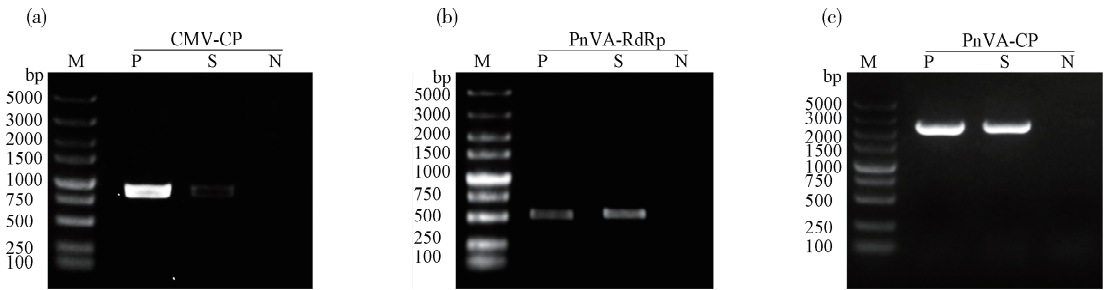


图 2 三七病样 CMV 和 PnVA 的 RT-PCR 检测结果
(a) CMV CP 的 PCR 结果;(b) PnVA-RdRp 的 PCR 结果;(c) PnVA CP 的 PCR 结果
M:DNA 分子量标准;P:阳性对照;S:三七病样;N:阴性对照
Fig. 2 RT-PCR results of CMV and PnVA in *Panax notoginseng* disease samples

3.3 三七上病毒病的发生情况

3.3.1 三七上 CMV 的发生情况 对不同地区三七种植园区的 CMV 发生情况进行统计后发现,各地病毒检出率均在 42.86% 以上。不同地区的 CMV 检出率有一定的差异,其中重庆荣昌检出率最高,高达 60%,其次是四川射洪的样本,检出率为 58.82%,云南丘北和云南建水的样本的检出率均为 50.00%,四川乐至和四川阆中的样本检出率较低,检出率均为 46.15%(图 3)。云南富源采集的样本 CMV 的检出率最低,仅有 42.86%。总体来看,2019 年以来,CMV 侵染三七的现象比较常见。

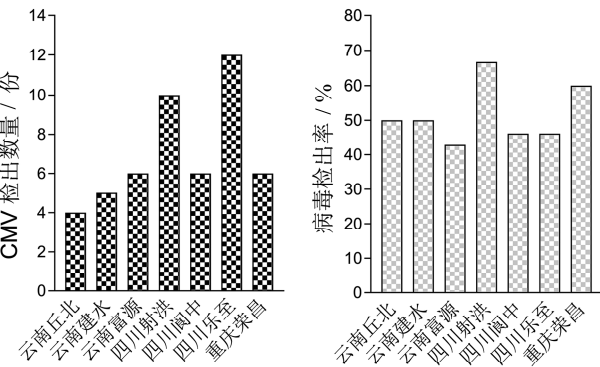


图 3 各地三七上 CMV 的发生情况
Fig. 3 The occurrence of CMV on *Panax notoginseng* in different areas

3.3.2 三七上 PnVA 的发生情况 对不同地区的 PnVA 的病毒检出情况进行统计,发现不同地区的 PnVA 检出率较高。除重庆荣昌外,其余各地的 PnVA 检出率均在 50% 以上,其中以云南建水的检出率最高,高达 80%;其次是云南丘北的样本,检出率 75%;四川射洪、阆中、乐至的三七种植园中 PnVA 的检出率分别为 64.71%、61.54%、61.54%,均在 60% 以上(图 4)。三省(市)PnVA 的检出率从高到低分别为云南(70.71%)、四川

(63.93%)、重庆(40%)。

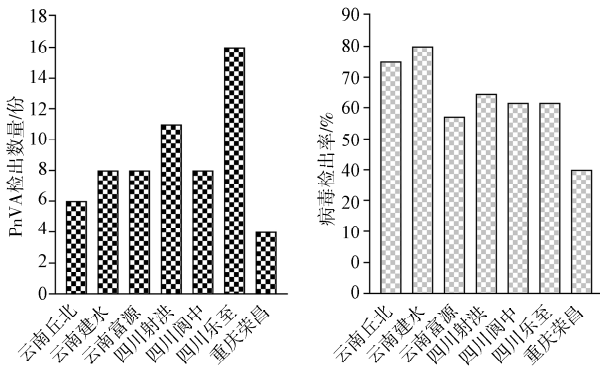


图 4 各地三七上 PnVA 的发生情况
Fig. 4 The occurrence of PnVA on *Panax notoginseng* in different areas

3.3.3 三七上病毒复合侵染情况 三个省份七个地区的 96 份样本中,有 79 份样本检测到病毒,病毒的综合检出率(检测到 CMV 或 PnVA 其中一种病毒)为 82.29%;其中检测到 CMV 样本 49 份,CMV 的检出率为 51.04%;检测到 PnVA 的样本 61 份,PnVA 的检出率为 63.54%。CMV 和 PnVA 复合侵染的样本 31 份,复合侵染率为 32.29%;仅检测到 CMV 和 PnVA 的样本分别为 18 份、30 份,检出率为 18.75%、31.25%(图 5)。总体来看,PnVA 的检出率高于 CMV 的检出率,而且两种病毒复合侵染三七的现象比较常见。

3.3.4 三七上不同种类的病毒可能引发的症状类型 经调查发现,田间三七病毒病最常见的四种症状是:皱缩、黄化、花叶和驴耳;其中麻点症状在四川、重庆的七园中较为常见。对不同样本检测到的病毒及其对应的症状进行统计(白化、丛顶、蕨叶的三七病样的数量较少,未对其病毒检出率进行统计分析)后发现:各个症状的样品中的病毒检出率由高到低分别为:麻点(100%)、驴耳(92.31%)、花

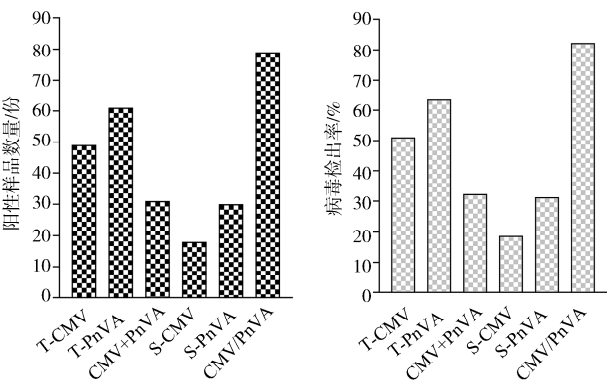


图 5 三七上 CMV 和 PnVA 的复合感染情况
T-CMV:CMV 侵染总和;T-PnVA:PnVA 侵染总和;CMV+PnVA:CMV 和 PnVA 复合侵染;S-CMV:仅有 CMV 侵染;S-PnVA:仅有 PnVA 侵染;CMV/PnVA:CMV 或 PnVA 侵染
Fig. 5 Mixture infection of CMV and PnVA on *Panax notoginseng*

叶(85.71 %)、皱缩(81.48 %)、黄化(78.95 %)、斑驳(71.43 %). 麻点症状的所有三七病样中均检测到病毒,斑驳症状的三七样本病毒检出率最低. 值得注意的是,斑驳症状的病叶中,仅检测到 CMV 的样品数为 0,而仅检测到 PnVA 的样本数占总样本数的 50 %;在麻点症状的病样中,12.5 % 的样本仅检测到 CMV,而其余样品中均检测到 PnVA(图 6). 综上,PnVA 可能是麻点症状和斑驳症状三七叶的主要致病病原,和 CMV 也有一定的关系. 此外,在丛顶症状和蕨叶症状的三七病样中,仅检测到 PnVA,未检测到 CMV,由此猜测 PnVA 可能是导致三七丛顶和蕨叶的主要病原,但是由于样本数量较少,并不能完全确定.

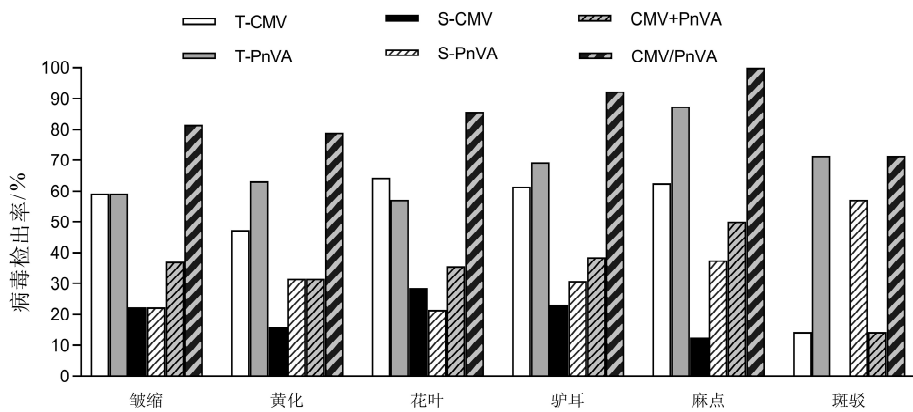


图 6 不同病害症状三七的病毒检出率
T-CMV:CMV 侵染总和;T-PnVA:PnVA 侵染总和;CMV+PnVA:CMV 和 PnVA 复合侵染;S-CMV:仅有 CMV 侵染;S-PnVA:仅有 PnVA 侵染;CMV/PnVA:CMV 或 PnVA 侵染
Fig. 6 Virus detection rate of *Panax notoginseng* with different disease symptoms

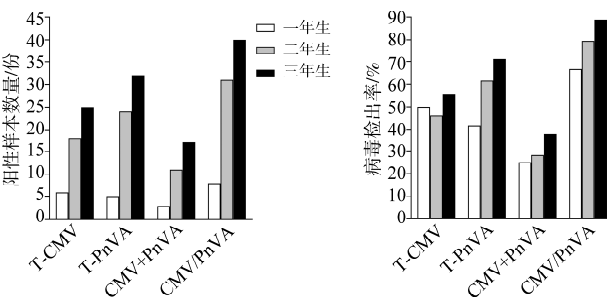


图 7 田间不同苗龄三七上的病毒发生情况
T-CMV:CMV 侵染总和;T-PnVA:PnVA 侵染总和;CMV+PnVA:CMV 和 PnVA 复合侵染;S-CMV:仅有 CMV 侵染;S-PnVA:仅有 PnVA 侵染;CMV/PnVA:CMV 或 PnVA 侵染
Fig. 7 Occurrence of viruses on *Panax notoginseng* with different seedling ages in field

3.3.5 田间不同苗龄三七上的病毒发生情况 对不同苗龄的三七上病毒病的发生情况进行统计后发现,一年生三七、二年生三七、三年生三七 CMV 的检出率分别为 50 %、46.15 %、55.56 %。随着三七

苗龄增加 CMV 检出率的变化并不明显,但是能看出三年生三七上的 CMV 检出率高一年生三七. 值得注意的是,PnVA 的检出率,CMV 和 PnVA 的复合侵染率,病毒综合检出率都随着三七苗龄的增加而显著增加(图 7). 三年生三七病样的 PnVA 检出率为 71.1 %,比一年生三七 PnVA 检出率高 20 % 左右. 三年生三七病样的病毒综合检出率甚至高达 88.89 %。综上,随着苗龄的增加,三七上的病毒病的发生率呈上升趋势.

3.4 相关病毒分离物 CP 基因核苷酸序列分析
3.4.1 三七病毒病样 CMV 分离物的 CP 基因核苷酸序列多样性分析 对各地分离得到的 CMV CP 基因的核苷酸序列进行一致性比较,发现三七上分离得到的 CMV CP 基因变异较小,各个地区的 CMV CP 的一致性较高,介于 99.2 %~100 %之

间(表 3). 系统进化树分析结果显示(图 8), 7 个地区 CMV CP 分离物均属于 CMV 亚组 I 的病毒, 且主要聚集在 2 个分支上, 其中云南富源分离物 YNFY09、云南丘北分离物 YNQB25、重庆荣昌分离物 CQRC76、四川阆中分离物 SCLaZ37 聚集在 1 个分支; 从表 3 发现云南富源, 云南丘北的分离物

CP 序列完全一致, 从系统进化树上来看其亲缘关系最近. 云南建水分离物 YNJS34、四川乐至分离物 SCLeZ54、四川射洪分离物 SCSH16 则聚集在另一个分支, 该分支上亲缘关系最近的是四川乐至分离物和四川射洪分离物.

表 3 CMV 分离物 CP 基因核苷酸序列一致性的比较(%)

Tab. 3 Identities comparison of nucleotide sequence of CP gene in CMV isolates (%)

分离物 Isolates	YNFY09	YNQB25	CQRC76	SCLaZ37	YNJS34	SCLeZ54	SCSH16	CMV SD	CMV Fny	CMV Xb	CMV YN-B
YNFY09	—										
YNQB25	100	—									
CQRC76	99.8	99.8	—								
SCLaZ37	99.5	99.5	99.4	—							
YNJS34	99.5	99.5	99.7	99.4	—						
SCLeZ54	99.7	99.7	99.5	99.5	99.8	—					
SCSH16	99.4	99.4	99.2	99.2	99.5	99.7	—				
CMV SD	94.7	94.7	94.5	94.5	94.8	95	94.7	—			
CMV Fny	92.2	92.2	92.1	92.1	92.4	92.6	92.2	94.1	—		
CMV Xb	77.1	77.1	77.2	76.6	76.9	76.7	76.6	77.7	77.4	—	
CMV YN-B	76.7	76.7	76.9	76.3	76.6	76.4	76.3	77.7	77.1	98.3	—

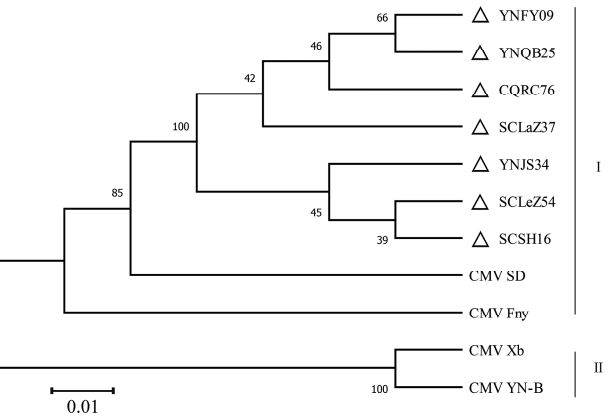


图 8 CMV 分离物的 CP 基因核苷酸序列的系统进化树代表本研究获得的 CMV 分离物
Fig. 8 Phylogenetic tree of CMV isolates based on CP gene nucleotide sequence

3.4.2 三七病毒病样 PnVA 分离物的 CP 基因核苷酸序列多样性分析 我们对各地分离得到的 PnVA CP 序列进行一致性比较, 各个地区的分离物的核苷酸序列一致性介于 94.4%~99.7% 之间(表 4). 系统进化树分析结果显示, 7 个三七园区 PnVA CP 的分离物主要聚集在 3 个分支上, 其中重庆荣昌分离物 CQRC72 单独在 1 个分支; 四川

阆中分离物 SCLaZ37 与 NCBI 报道的云南石林分离物 YNSL1210(登录号 KT388111)在 1 个分支, 两者核苷酸一致性高达 98.9%; 其余 5 个园区的分离物聚集在在另 1 个分支, 在该分支中云南富源分离物 YNQB05 和云南丘北的分离物 YNQB28, 聚集到一个小分支上, 亲缘关系最近; 其次是四川乐至 SCLeZ50 和四川射洪分离物 SCSH11 的分离物, 也聚集到另一个小分支上(图 9).

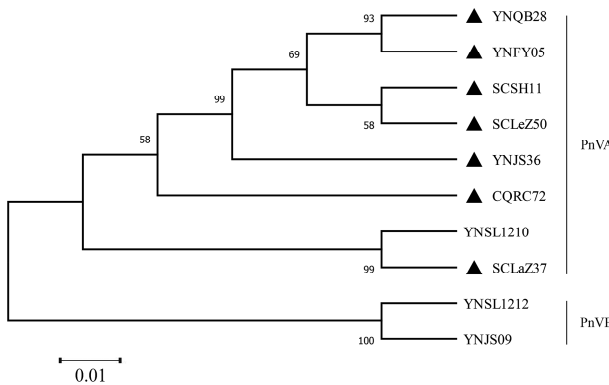


图 9 PnVA 分离物的 CP 基因核苷酸序列的系统进化树代表本研究获得的 PnVA 分离物
Fig. 9 Phylogenetic tree of PnVA isolates based on CP gene nucleotide sequence

表 4 PnVA 分离物 CP 基因核苷酸序列一致性的比较(%)

Tab. 4 Identities comparison of nucleotide sequence of CP gene in PnVA isolates (%)

分离物 Isolates	YNQB28	YNQJ05	SCSH11	SCLeZ50	YNJS36	CQRC76	YNSL1210	SCLaZ37	YNSL1212	YNJS09
YNQB28	—									
YNQJ05	99.7	—								
SCSH11	99.6	99.6	—							
SCLeZ50	99.5	99.5	99.7	—						
YNJS36	99.1	99.1	99.5	99.3	—					
CQRC76	95.6	95.4	95.3	95.2	95.3	—				
YNSL1210	97.7	97.7	97.7	97.7	98.0	95.1	—			
SCLaZ37	97.1	97.1	97.1	97.1	97.5	94.4	98.9	—		
YNSL1212	72.5	72.5	72.4	72.5	72.4	70.8	72.4	72.6	—	
YNJS09	72.9	72.9	72.8	72.9	72.8	71.2	72.6	72.6	93.8	—

4 讨 论

三七作为重要的传统中草药,主要以其根茎入药.三七一旦感染病毒病,最直观最明显的症状往往首先表现在叶片上.病毒侵染导致三七叶片出现不同的症状,目前对于三七病毒病的研究工作也主要针对其叶片进行.鉴于地上部分和地下部分存在紧密相关性,三七叶片上发生的病毒病可能间接的影响着地下根茎的生长以及代谢物的积累.植物病毒病素来被称为植物的“癌症”^[27],目前对于病毒病的防治依然停留在预防阶段.因此,掌握病毒病的发生规律和各致病病原变异的多样性,对其防控有至关重要的作用.

本研究发现未检测到 CMV、PnVA 和其他病毒的 20 个样本表现的症状与检测到病毒的样本有较高的相似性.由此猜测,三七中还存在这两种病毒以外的未知病毒,目前仍未被检测到.同时也说明,不同病毒复合侵染三七,是三七病毒病症状多样化的主要原因之一.金羽^[9]在三七上首次获得 CMV 的 CP 分离物,该分离物经 BLAST 比对后,发现为与 CMV_fny 株系的 CP 序列完全一致,但在后续的研究中 CMV 一直未被检测到^[18, 20].本研究利用 CMV 的通用引物在各地均检测到 CMV 的发生,这也是继 2005 年后,再次在三七上检测到 CMV.本研究分离得到的 CMV CP 序列变异较小,均属于 CMV 亚组 I,与 CMV-fny 株系的序列一致性在 92.1%~92.6%之间;而 PnVA 的 CP 分离物与 Guo 等^[19]报道的 PnVA 的云南石林分离物 YNSL1210 的 CP 序列一致性在 95.1%~98.0%之间.从系统进化树中(图 6,图 7),我们发

现云南富源和云南丘北两地,四川射洪和四川乐至两地的 CMV CP 和 PnVA CP 分离物的亲缘关系都非常相近.经调查后发现,云南丘北和富源的种苗均来自丘北,而四川射洪和乐至的种苗也都来自四川大英,由此可以猜测,病毒在三七幼苗时期就已经侵染了三七,并在三七上一直存活了下来,并不断积累.前人研究发现,在种子出苗或种苗出苗后,即有病毒病症状出现,由此猜测种子或种苗可以携带病毒^[28].但是在此前的研究中,我们随机抽取了多粒种子提取 RNA 进行病毒检测,均未检测到病毒,可见种子传毒的可能性极小.目前已知有 2 目 4 科的昆虫可在三七上传播病毒,如粉虱类、叶蝉类、飞虱类和蚜虫类等会加速田间三七病毒病的传播^[29].CMV 主要通过蚜虫传播,可侵染 1000 多种单、双子叶植物,CMV 在大田作物、蔬菜上的发生十分普遍^[30].本研究在大量的样本中检测到 CMV,昆虫的传毒可能是导致三七种苗带毒的主要原因.因此,通过可控的设施条件(如温室)培育健康无毒无菌三七苗,再移栽到田间,并加强田间水肥,杂草,虫害管理,可以在一定程度上阻断或减轻三七病毒病的发生与传播.

在云南、四川、重庆的三七基地病害发生情况的调查中发现.四川、重庆两地的部分七园中出现的圆斑病,黑斑病、灰霉病等真菌性病害较多.三七虫害方面,蛴螬成为四川、重庆七园中主要的虫害,在四川乐至的部分七园中出现大面积蛴螬虫害,损失惨重.值得注意的是,在这类七园中病毒病的发生率相对较低,且类型较单一,以麻点,皱缩症状为主.与真菌,细菌,虫类不同,病毒在三七上主要以寄生为主,需要从寄主中不断地汲取养分^[31],因此

不会让寄主植物过早凋亡.我们在温室继续培养的病株中,当年检测到了病毒,翌年在新发叶上同样检测到该病毒.由此可见病毒在三七上是长期存在的,并不会因为地上部分的枯萎而消失.在本研究中发现,三年七上的病毒病发生率高于二年七和一年七的病毒病发生率,这与刘云芝等^[28]报道高龄三七病情明显比低龄三七病情严重的结果是一致的.以上或是病毒病发生率随苗龄的增加不降反增的原因,也是病毒病难以防治或根除的主要原因之一.

由于三七的病毒病的症状常由多种病毒复合侵染而形成,迄今尚未从三七病株上获得的单一毒源^[20],加之田间环境比较复杂,很难找到完全健康无毒的植株进行实验验证,因此没有单一病毒侵染对三七生长和代谢影响的相关研究. CMV 作为十大植物病毒之一,可以侵染多种植物^[30]. 鉴于 CMV 在三七上的高频发生状况,本研究在不断摸索中,已在可控环境中,成功种植出健康三七,并已建立三七-CMV 互作体系.后续将对 CMV 侵染对三七生长、基因表达以及有效成分——三七皂苷生物合成的影响做进一步研究.

综上,在云南、四川、重庆的三七种植园区的三七上病毒病发生比较普遍,其病原主要为 CMV 和 PnVA,两种病毒复合侵染三七的现象比较常见.随着三七苗龄的增加,病毒检出率呈现逐年上升趋势.种苗来自同一地点的三七上的病毒分离物亲缘关系最近,种苗或成为三七上病毒传播的主要源头.四川、重庆各地病毒病的发生情况与云南主产区相比并无显著差别,PnVA 的发生率甚至低于云南主产区.仅从病毒病害发生情况来看,四川、重庆等地引种栽培三七具有较强的可行性.

参考文献:

[1] Zhang D, Li W, Xia E H, *et al.* The medicinal herb *panax notoginseng* genome provides insights into ginsenoside biosynthesis and genome evolution [J]. Mol Plant, 2017, 10: 903.

[2] Zhang D, Li W, Chen Z J, *et al.* SMRT- and Illumina- based RNA-seq analyses unveil the ginsenoside biosynthesis and transcriptomic complexity in *Panax notoginseng* [J]. Sci Rep, 2020, 10: 15310.

[3] 李宏伟,郭富贵,刘洋,等.三七病虫害研究现状与展望[J].草业科学,2019,36:13.

[4] 马妮,王勇,刘云芝,等.三七病毒病对三七产量和质量的影响研究[J].现代农业科技,2015,

44: 110.

[5] 徐文虹.三七农药残留测定方法的研究及展望[J].轻工科技,2018,34:126.

[6] 陈昱君,王勇,李晓静,等.三七病毒病症状类型及分布调查初报[J].云南农业大学学报:自然科学版,2016,31:7.

[7] 王勇,范昌,陈昱君,等.三七的主要病害及防治现状[J].人参研究,2003,15:43.

[8] 宋丽敏.三七病毒病害病原的初步鉴定[D].北京:中国农业大学,2005.

[9] 金羽.三七病毒病原的初步研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2005.

[10] 陈昱君,王勇,李晓静,等.三七病毒病症状类型及分布调查初报[J].云南农业大学学报:自然科学版,2016,31:28.

[11] 宋丽敏.三七上番茄花叶病毒的初步鉴定[J].云南农业大学学报:自然科学版,2003,18:111.

[12] 陈燕芳,金羽,李桂芬,等.三七病毒病鉴定初报[J].植物检疫,2004,4:212.

[13] 张永江,金羽,李桂芬,等.三七上一种新线状病毒的初步研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33:75.

[14] 杨建忠,王勇,张葵,等.蓟马危害三七调查初报[J].中药材,2008,31:3.

[15] Yan Z L, Song L M, Zhou T, *et al.* Identification and molecular characterization of a new potyvirus from *Panax notoginseng* [J]. Arch Virol, 2010, 155: 949.

[16] 李梅蓉,李晓静,包改丽,等.三七 Y 病毒部分 ci 基因和 cp 基因的克隆及序列分析[J].云南农业大学学报:自然科学版,2016,31:35.

[17] Li R H, Liu F, Li X J, *et al.* First report of tomato yellow leaf curl China virus with betasatellite infecting *Panax notoginseng* [J]. Plant Dis, 2014, 98: 1284.

[18] 李晓静.三七病毒病原种类鉴定及其相关病毒分子变异分析[D].昆明:云南农业大学,2014.

[19] Guo L F, Yang X, Wu W, *et al.* Identification and molecular characterization of *Panax notoginseng* virus A, which may represent an undescribed novel species of the genus *Totivirus*, family *Totiviridae* [J]. Arch Virol, 2016, 161: 731.

[20] 杨馨,孟钰,李梅蓉,等.云南三七病毒病的发生及病毒种类检测[J].植物病理学报,2019,49:456.

[21] Wu Q, Ma X, Zhang K, *et al.* Identification of reference genes for tissue-specific gene expression in *Panax notoginseng* using quantitative real-time PCR

[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37: 197.

[22] Bag S, Druffel K L, Pappu H R. Structure and genome organization of the large RNA of iris yellow spot virus (genus *Tospovirus*, family Bunyaviridae) [J]. Arch Virol, 2010, 155: 275.

[23] Yang T, Qiu L, Huang W Y, *et al.* Chilli veinal mottle virus HCPro interacts with catalase to facilitate virus infection in *Nicotiana tabacum* [J]. J Exp Bot, 2020, 18: 5656.

[24] 熊艳, 杨帅, 青玲, 等. 四川番茄黄化曲叶病病原分子鉴定及变异分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44: 8.

[25] 彭期定, 吕蕊, 杨婷, 等. 四川地区猕猴桃病毒 1 的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因序列分析[J]. 园艺学报, 2020, 47: 120.

[26] 邹佳伶, 彭期定, 王韵茹, 等. 猕猴桃褪绿环斑相关病毒 RT-LAMP-LFD 可视化检测方法的建立[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2022, 59: 016004.

[27] 王端, 姚香梅, 叶健. 根际微生物-植物-病毒-介体昆虫多元互作研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34: 12.

[28] 刘云芝, 王勇, 孙玉琴, 等. 三七皱缩型病毒病发生规律调查研究[J]. 现代农业科技, 2015, 44: 105.

[29] 陈昱君, 王勇, 杨建忠, 等. 三七病毒病媒介昆虫诱集试验研究[J]. 现代农业科技, 2015, 44: 3.

[30] Karen-Beth G, Stholthof, Scott A, *et al.* Top 10 plant viruses in molecular plant pathology [J]. Mol Plant Pathol, 2011, 12: 938.

[31] 颜克如, 毛碧增. 植物病毒脱毒技术进展与展望[J]. 分子植物育种, 2019, 17: 10.

引用本文格式:

中 文: 郑天锐, 彭期定, 杨道勇, 等. 云、川、渝三七病毒病病原种类检测及多样性分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 056004.

英 文: Zheng T R, Peng Q D, Yang D Y, *et al.* Detection and diversity analysis of viruses infecting *Panax notoginseng* in Yunnan province, Sichuan province and Chongqing municipality [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 056004.