

利用小RNA深度测序技术从新疆葡萄上检出8种病毒

Eight viruses were detected from Xinjiang grapes by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs

于 翠¹ 乾义柯² 于子翔¹ 陆 平² 陈仲兵¹ 易建平^{1*}

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 伊犁出入境检验检疫局, 新疆 伊犁 835000)

Yu Cui¹ Qian Yike² Yu Zixiang¹ Lu Ping² Chen Zhongbing¹ Yi Jianping^{1*}

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yili 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Kreuze et al.(2009)发现病毒特异的小RNA(small RNA, sRNA)为多拷贝的重叠序列,推测可通过深度测序技术获得病毒的大量sRNA序列,经拼接和比对分析后能高效鉴定病毒种类。目前,利用sRNA深度测序技术已在作物和昆虫上发现多种病毒(Liu et al., 2011; He et al., 2015)。2013年本课题组在葡萄病害调查过程中发现,伊犁州部分地区的葡萄在种植4~5年后,叶片黄化、变小,整个植株矮化,座果率低,严重时甚至整株枯死;有的葡萄园发病植株达80%,造成极大的经济损失。本试验采集黄化、矮缩的葡萄病叶,利用sRNA深度测序技术进行检测,以期快速准确鉴定葡萄上携带病毒提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试样品:葡萄病叶于2014年采自伊犁州霍城县61团葡萄园,症状表现为黄化、小叶,部分叶片叶缘焦枯。2015年分别从霍尔果斯、石河子、昌吉、库尔勒和伊犁70团和61团葡萄园共采集52份表现类似症状病叶用于田间样品检测,葡萄品种均为红提。

试剂及仪器:所有测序试剂,美国Illumina公司;捕获磁珠AmpureBeads,美国Beckman公司;Qubit定量Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit,美国Life公司;一步法RT-PCR检测试剂盒,日本TaKaRa公司。Hisq 2000高通量测序仪、CBOT簇生成仪,美国Illumina公司;Veriti PCR仪,美国ABI公司。

1.2 方法

sRNA的Solexa深度测序及分析:采集的葡萄病叶参照Trizol说明书提取植物总RNA。利用醋酸锂和聚乙二醇法分离sRNA,测定浓度并电泳质检RNA。RNA样品送上海昂朴生物科技有限公司进

行深度测序。总RNA分别在5'端和3'端加上接头;随机引物反转录获得cDNA第一链;PCR富集;产物PAGE电泳回收;定量miRNA文库;cBot上桥式扩增,生成clusters。运用Hiseq 2000上机测序。将Solexa测序原始数据切除污染序列、接头序列和尾部低质量碱基,然后采用Velvet软件进行序列拼接,获得重叠序列,利用BLASTn、NCBI nt库和nr库进行比对和注释分析,以明确葡萄样品所携带的病毒。

RT-PCR验证:提取sRNA测序剩余葡萄样品RNA,根据sRNA测序结果利用8对特异引物,即针对葡萄卷叶病毒2号(*Grape leafroll-associated virus 2*, GLRaV-2)的V2dCPf2/V2CPr1(5'-ACGGTGTGC-TATAGTGCCTG-3'/5'-GCAGCTAAGTACGAATCT-TC-3')、葡萄砧木茎病变伴随病毒(*Grapevine rootstock stem lesion associated virus*, GRSLaV)的RGH-SP227/RGHSP777(5'-GCGACTCCAGCAACTTTA-GTGA-3'/5'-GTCTAACGAAAGATCGGGTTCTAA-G-3')、葡萄黄点类病毒1号(*Grape yellow speckle viroid 1*, GYSVd1)的GYSVd-f1/GYSVd-r1(5'-TTG-AGGCCTGGCGTAACGC-3'/5'-GGACGCGAACGT-GAATAGG-3')、葡萄黄点类病毒2号(*Grape yellow speckle viroid 2*, GYSVd2)的GYSVd-f2/GYSVd-r2(5'-ACTAGTACTTTCTTCTATCTCCGAAGC-3'/5'-ACTAGTCCGAGGACCTTTTCT-3')、葡萄斑点病毒(*Grapevine fleck virus*, GFkV)的U-279/L-630(5'-TG-GTCCTCGGCCAGTGAAAAAGTA-3'/5'-GGCCA-GGTTGTAGTCGGTGTGTC-3')、啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*, HSVd)的HSVd-R/HSVd-F(5'-GCGTCTCATCGGAAGAGCC-3'/5'-GACCGGTGG-CATCACCTCT-3')、葡萄灰皮诺病毒(*Grapevine Pi-*

not gris virus, GPGV)的GPGV-6609F/GPGV-7020R (5'-GAGATCAACAGTCAGGAGAG-3'/5'-GACTTCTGGTGCCTTATCAC-3')及澳大利亚葡萄类病毒(*Australia grape viroid*, AGVd)的AGVd-MF/AGVd-MF(5'-GTCCTCAGGAGACCCGG-3'/5'-GAAA-ACTGGTTGGGACCGCTG-3')进行一步法RT-PCR,验证深度测序结果并进一步确定感病葡萄的病毒种类。退火温度分别为55、60、56、56、55、58、54、56℃,预期产物大小分别为589、551、367、374、315/415、300、411、195 bp。PCR产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序,经BLAST进行同源性比较。采用上述方法对52份田间样品进行RT-PCR验证,以明确新疆各地葡萄携带的病毒种类。

1.3 数据分析

采用SPSS 11.5统计软件对试验数据进行处理,计算毒力回归方程式、 LC_{50} 及其95%置信限。

2 结果与分析

2.1 葡萄样品sRNA测序及分析

感病葡萄叶片经总RNA提取、纯化和Solexa测

序得到 1.2×10^7 个reads,经质控后获得 1.1×10^7 个reads,其中21 nt的reads数为1 210 274个,约占reads总量的10.9%。对处理后的reads根据序列相似性进行组装拼接,获得有效重叠序列2 287个,包含167 338 bp,平均每个contig长73 bp,最长的contig为1 167 bp,GC含量为42.7%。将获得的contigs进行比对注释发现,与病毒及类病毒相关的有8种118条,分别是50条GLRaV-2、41条GRSLaV、8条GYSVd1、7条GYSVd2、5条GFkV、3条HSVd、3条GPGV及1条AGVd。

2.2 RT-PCR验证sRNA测序结果

8对特异引物从sRNA测序余样中均能扩增到上述8种病毒和类病毒,条带大小与预期片段一致,序列分析也表明扩增条带为目的病毒序列,表明深度测序结果准确。

2.3 田间葡萄样品的检测验证结果

根据sRNA测序结果,2015年在石河子、昌吉、玛纳斯、库尔勒、霍尔果斯、伊犁70团和61团等地采集的样品中普遍检出了HSVd和GLRaV2,而GPGV和AGVd仅在伊犁70团和61团有零星发现(表1)。

表1 田间葡萄样品RT-PCR检测结果

Table 1 The detection results for virus/viroid samples from different grape fields by RT-PCR

地点 Location	检测结果(阳性数/样品数) Detection results (No. of positive/No. of samples)							
	HSVd	GRSLaV	GFkV	GYSVd1	GYSVd2	GLRaV-2	GPGV	AGVd
霍尔果斯 Khorgos	15/15	10/15	12/15	8/15	8/15	8/15	0/15	0/15
石河子 Shihezi	8/8	0/8	2/8	0/8	0/8	4/8	0/8	0/8
昌吉 Changji	5/5	0/5	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5
库尔勒 Korla	3/5	2/5	3/5	2/5	3/5	3/5	0/5	0/5
伊犁70团 No. 70 Corps of Yili	7/7	4/7	0/7	3/7	2/7	5/7	0/7	1/7
伊犁61团 No. 61 Corps of Yili	10/12	5/12	0/12	0/12	4/12	8/12	1/12	2/12
合计 Total	48/52	21/52	18/52	13/52	17/52	30/52	1/52	3/52

3 讨论

本试验利用sRNA深度测序技术从采自伊犁州的表现黄化、小叶的葡萄叶片中同时检出8种病毒和类病毒,利用RT-PCR进行验证,二者结果一致。对新疆不同地区表现类似症状葡萄样品的检测结果均表明葡萄上存在着复杂的病毒复合感染,利用sRNA深度测序技术还从伊犁61团葡萄园的葡萄上检出GPGV,为2012年葡萄上发现的新病毒(Giampetruzzia et al., 2012)。仅靠传统的检测方法逐一验证不仅耗时且检测结果不完整,深度测序技术的发展开辟了大规模快速诊断植物病毒的途径,提高了筛查木本植物病毒的效率,伴随着该技术成本的降低,sRNA深度测序将成为一种经济有效、值得推广使用的病毒筛查方法。

参考文献 (References)

- Giampetruzzia A, Roumia V, Robertoa R, Malossini U, Yoshikawa N, La Notte P, Terlizzi F, Credi R, Saldarelli P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1): 262-268
- He Y, Yang Z, Hong N, Wang G, Ning G, Xu W. 2015. Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease. *Molecular Plant Pathology*, 16(5): 449-458
- Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, Simon R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1): 1-7
- Liu S, Vijayendran D, Bonning BC. 2011. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. *Viruses*, 3(10): 1849-1869

(责任编辑:李美娟)