

苹果茎痘病毒新疆阿克苏分离物基因组全序列测定及分析

Determination and analysis of whole genome sequence of *Apple stem pitting virus* isolate AKS from Xinjiang, China

龚卓群 郝璐 谢吉鹏 国立耘 周涛*

(中国农业大学植物病理学系, 北京 100193)

Gong Zhuoqun Hao Lu Xie Jipeng Guo Liyun Zhou Tao*

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

苹果病毒病在世界各苹果种植地广泛发生,严重影响苹果生产。苹果茎痘病毒(*Apple stem pitting virus*, ASPV)是一种危害苹果的重要潜隐病毒,是凹陷病毒属 *Foveavirus* 的代表种(Adams et al., 2004),基因组为正单链 RNA,长约 9 306 nt,编码 5 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。自然寄主有苹果、梨、樱桃和海棠等,被 ASPV 侵染后一般症状不明显,但生长不良,树势衰退,果实产量和品质下降(郝璐等, 2015)。目前 GenBank 中收录了 ASPV 共 12 个分离物的基因组序列,国内仅报道了 1 个 ASPV 苹果分离物基因组全序列(陈姗姗等, 2014)。新疆维吾尔自治区(简称新疆)苹果种质资源丰富,近年来阿克苏等地区的苹果栽培发展迅速,病毒病已对当地苹果产业造成了严重危害,因此,本试验测定并分析了阿克苏地区富士苹果中 ASPV 分离物基因组全序列,以期有效防控该地区苹果病毒病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试苹果:2013 年 8 月在新疆阿克苏市果园采集了 1 个疑似被病毒侵染表现花脸症状的富士苹果果实样品,带回实验室于 4℃ 保存备用。

试剂及仪器:T4 DNA 连接酶、pMD19-T Simple 载体、RNase H 酶等,宝生物工程(大连)有限公司;Golden Taq DNA 聚合酶,北京泛基诺科技有限公司。S1000™ Thermal Cycler PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;EPS 301 电泳仪及 JY04S-3C 型紫外凝胶成像仪,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

ASPV 的 RT-PCR 检测及基因组全序列克隆:用 CTAB 法提取果实总 RNA,以随机引物反转录产生的

cDNA 为模板,利用引物对 ASPV-F(5'-TGCCT-CAAAGTACACCCCTCAGT-3')和 ASPV-R(5'-CGC-CAAGAAATGCACAGC-3')进行 PCR 扩增。反应体系:2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL、正反向引物各 0.5 μL、反转录产物 2.0 μL,ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s;退火温度下复性 45 s;72℃ 延伸,35 个循环;72℃ 10 min。使用表 1 中所列引物和扩增条件进行 ASPV 基因组片段和 cDNA 末端的快速扩增。PCR 产物均克隆到 pMD19-T Simple 载体。

基因组全序列拼接与系统进化树分析:将 PCR 验证为阳性的克隆进行测序,利用 DNAMAN 8 及 DNASTar Lasergene 7.1 软件进行序列拼接,所获序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对。收集 GenBank 中所有 ASPV 基因组全序列,利用 Clustal X 与 Mega 6.0 软件构建系统发育树,以葡萄茎痘病毒(*Grapevine rupestris stem pitting associated virus*, GRSPaV)作为系统发育分析外群,重复次数为 1 000。将 GenBank 中 ASPV 外壳蛋白(CP)氨基酸序列导入 DNAMAN 8 进行多重序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 样品中 ASPV 的检测

从新疆阿克苏富士苹果样品中扩增得到特异的 316 bp 目标条带,分析表明该片段为 ASPV 基因组部分序列,说明采集的样品被 ASPV 侵染。

2.2 基因组全序列及 CP 氨基酸序列比对分析

拼接得到 ASPV 基因组全长 9 296 nt,序列比对分析表明其与 GenBank 中 ASPV 基因组序列相似度最高,为 69.94%~79.9%,将该分离物命名为阿克苏分离物 ASPV AKS(KY242757),编码 5 个 ORFs,为 ORF1~ORF5。ORF1(60~6 611 nt)编码 247.0 kD 的

复制相关蛋白;ORF2(6 705~7 376 nt)、ORF3(7 378~7 740 nt)和ORF4(7 649~7 876 nt)编码25.1、12.7和7.9 kD的移动相关蛋白;ORF5(7 972~9 168 nt)编码42.3 kD的CP。ASPV AKS与印度分离物相似度最高,各个ORF与其它12个基因组全序列的分离物所对应的氨基酸相似度在72.00%~95.96%之间。ASPV AKS分离物CP氨基酸序列与其它ASPV CP氨基酸序列相似度在70.15%~85.43%之间。

表1 扩增ASPV AKS基因组片段所用引物及扩增条件
Table 1 Primers and PCR parameters for amplification of ASPV AKS genome fragments

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Primer sequence	位置 Position	大小Size (bp)	退火温度 (°C) Annealing temperature	延伸时间 (s) Extension time
P1-F	CCGTGATTCTGATAAGGGTC	8-3 816	3 809	56	240
P27-R	GGTCAACACTACCACAGATG				
P8-F	TCATTGTGCAGCATAATCATCTC	6 506-9 296	2 795	56	180
P32-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAATCTAG				
P43-F	GACGGGAAGTCTTTTG	3 319-7 000	3 682	55	240
P42-R	CCGTGATTCTGATAAGGGTC				
5'RACE-P45-R	GGGCTAATGTGGAAGAAACC	341-360		55	30
5'RACE-P49-R	GATGAGAGTGAGGTCTGTAGG	168-188		57	30
5'RACE-Qo	CCAGTGAGCAGAGTGACG				
5'RACE-QT	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGA				
	GCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT				
5'RACE-QI	GAGGACTCGAGCTCAAGC				

2.3 ASPV 分离物全基因组系统进化树分析

对13个ASPV分离物基因组全序列构建系统进化树,结果显示,ASPV AKS分离物与PB66、Palampur、Palampur N及PB66聚为1组,与Palampur

N亲缘关系最近;3个梨上分离物及PA66聚为1组;YT、Hannover为1组;IF38、PM8为1组;共聚为4组(图1)。表明ASPV各分离物在遗传多样性上与寄主来源有一定联系,与地理分布无显著联系。

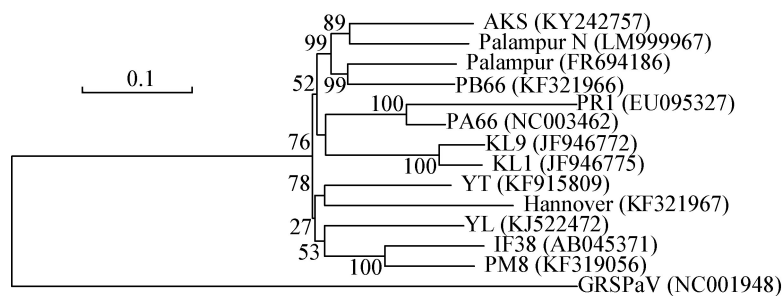


图1 基于ASPV分离物基因组全序列构建ASPV AKS分离物与其相近分离物的系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic analysis of ASPV AKS isolate and related isolates based on the complete nucleotide sequences

3 讨论

本试验测定并分析了新疆阿克苏地区ASPV苹果分离物AKS基因组全序列,丰富了我国ASPV分离物基因组全序列信息和分子特性。对13个ASPV分离物基因组全序列构建系统进化树,结果显示共聚为4组,说明与寄主来源有关,与陈珊珊等(2014)报道相似,为进一步研究ASPV种群遗传多样性及致病性差异提供了依据和参考。ASPV分离物间CP氨基酸序列相似度差异大,变异显著,这可能与ASPV致病性等生物学特性有关,还有待进一步研究。深入研究ASPV基因组变异及致病性,探讨防控新策略和新方法,可减轻ASPV对我国苹果产业的危害,促进我国苹果产业健康优质发展。

参考文献 (References)

Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG, Fauquet CM. 2004. Virology division news: the new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149(5): 1045-1060

Chen SS, Zhang ZX, Liu GJ, Lu MG, Li SF, Wang HQ. 2014. Identification and analysis of complete genomic sequence of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in China. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 248-249 (in Chinese) [陈珊珊, 张志想, 刘国杰, 卢美光, 李世访, 王红清. 2014. 苹果茎痘病毒苹果分离物的基因组序列测定及分析. *植物保护学报*, 41(2): 248-249]

Hao L, Ye T, Chen SY, Wang SJ, Zhou Y, Fan ZF, Guo LY, Zhou T. 2015. Occurrence and detection of virus diseases in some major apple-producing regions in northern China. *Plant Protection*, 41(2): 158-161 (in Chinese) [郝璐, 叶婷, 陈善义, 王少杰, 周颖, 范在丰, 国立耘, 周涛. 2015. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测. *植物保护*, 41(2): 158-161]

(责任编辑:王璇)