

葡萄卷叶伴随病毒 1 号河北和辽宁分离物 CP 基因序列分析

刘命华¹ 王克双¹ 齐洪华² 吕睦顼¹ 李捷¹ 程玉琴^{1*} 范在丰¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 北京农学院 植物科技学院, 北京 102206)

摘要 为获得葡萄卷叶伴随病毒 1 号(*Grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1)中国分离物的分子信息, 提高其检测可靠性, 本研究从河北怀来和辽宁兴城地区带有明显卷叶症状的葡萄样品中提取的叶柄韧皮部总 RNA, 采用 RT-PCR 克隆了 GLRaV-1 的河北(GLRaV-1-HB)和辽宁分离物(GLRaV-1-LN)的外壳蛋白(coat protein, CP)基因, 并进行了序列分析。结果表明: GLRaV-1-HB 和 GLRaV-1-LN 的 CP 基因核苷酸同源性为 90.7%, 由此推导的氨基酸同源性为 93.8%; 与已报道的国外 3 个 GLRaV-1 分离物的 CP 基因全序列相比, 其核苷酸与氨基酸序列同源性分别为 90.0%~96.0%和 92.9%~97.5%。以 CP 基因序列构建的进化树表明, 现有的 5 个分离物可分为 3 组, 其中本研究得到的 GLRaV-1-HB 和 GLRaV-1-LN, 分别与巴西分离物(GLRaV-1-PS, GenBank 登录号为 GQ332536.1)和伊朗分离物(GLRaV-1-IR-S7, FJ952151.2)为一组; 澳大利亚分离物(GLRaV-1-AUS, AF195822.1)单独为一组。

关键词 葡萄卷叶病; RT-PCR; 进化树

中图分类号 S 436.631

文章编号 1007-4333(2012)02-0090-04

文献标志码 A

Sequences analysis of CP genes in two isolates of *Grapevine leafroll-associated virus 1* from Hebei and Liaoning Province

LIU Ming-hua¹, WANG Ke-shuang¹, QI Hong-hua², LÜ Mu-di¹,

LI Jie¹, CHENG Yu-qin^{1*}, FAN Zai-feng¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract In order to improve the detection reliability, grapevine leaves with typical leafroll symptom originated from Huailai region in Hebei and Xingcheng region in Liaoning Province were detected for GLRaV-1 by RT-PCR. The complete sequences of coat protein (CP) gene of GLRaV-1-HB and GLRaV-1-LN isolates were amplified. Sequence comparisons revealed that GLRaV-1-HB and GLRaV-1-LN shared 90.7% and 93.8% identities at nucleotide and amino acid levels, respectively. In contrast with the reported 3 foreign isolates, the identities of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence ranged from 90.0% to 96.0% and 92.9% to 97.5%, respectively. The phylogenetic tree from alignments of CP nucleotide sequences of 5 GLRaV-1 isolates revealed the existence of three well-defined clusters. GLRaV-1-HB showed a close relationship with Isolate PS from Brazil (GLRaV-1-PS, GenBank accession number GQ332536.1), while GLRaV-1-LN and Isolate IR-S7 from Iran (GLRaV-1-IR-S7, FJ952151.2) clustered together. An Australia Isolate (GLRaV-1-AUS, AF195822.1) was grouped into a cluster alone.

Key words grapevine leafroll disease; RT-PCR; phylogenetic tree

收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-11-23

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30-bc-1)

第一作者: 刘命华, 硕士研究生, E-mail: liuminghua.1208@126.com

通讯作者: 程玉琴, 博士, 副教授, 主要从事植物病毒分子生物学研究, E-mail: chengyuqin@cau.edu.cn

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease, GLD)是葡萄上发生最为普遍和危害最严重的病毒病害之一。该病通常可导致葡萄减产30%~50%^[1],使果实中可溶性固形物含量下降28.72%^[2],严重影响葡萄产量和品质。目前已鉴定至少有10种葡萄卷叶伴随病毒(Grapevine leafroll-associated viruses, GLRaVs)与GLD发生相关^[3],且这些病毒可单独或混合侵染^[4-5]。GLRaVs均属于长线形病毒科(Closteroviridae),其中葡萄卷叶伴随病毒1号(*Grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1), GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-9为葡萄卷叶病毒属(*Ampelovirus*)成员, GLRaV-2属于长线形病毒属(*Closterovirus*), GLRaV-7还未确定为哪个属的成员^[6]。研究表明, GLRaV-1是与GLD相关的主要病原物之一^[7-8],因此目前世界各国在保存重要的葡萄无性系、品种及无病毒苗木认证时都需要检测包括GLRaV-1在内的一系列病原物^[9]。相对指示植物检测而言,RT-PCR以其快速和成本低而成为主要的检测方法,但由于GLRaV-1不同分离物间的蛋白基因如热激蛋白70同系物(heat shock protein 70 homologue, HSP70h)等的核苷酸序列变异较大,导致检测的可靠性下降^[9]。获得病毒基因组最保守区域(如CP基因)的分子信息,有助于提高分子检测的灵敏性和可靠性,但目前国内外对GLRaV-1基因组序列报道很少^[10-11]。本研究采用RT-PCR,克隆GLRaV-1河北(GLRaV-1-HB)和辽宁分离物(GLRaV-1-LN)CP基因,并进行序列分析,旨在获得GLRaV-1中国分离物的分子信息,以提高对GLRaV-1的分子检测水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒源

从河北怀来和辽宁兴城地区葡萄栽培基地采集的呈明显卷叶症状的葡萄叶片和枝条。

1.1.2 载体与菌株

pMD18-T载体试剂盒购自TaKaRa公司,大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 感受态细胞由本实验室保存。

1.1.3 酶及试剂

反转录酶购自Promega公司;RNase抑制剂、dNTP、ExTaq DNA聚合酶购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒购自爱思进(AxyGEN)公司。其他化学

试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取

CTAB法提取葡萄叶柄韧皮部RNA,进行了步骤的优化并省去了试剂PVP(polyvinylpyrrolidinone K30)和亚精胺的使用^[12]。1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度。

1.2.2 GLRaV-1的RT-PCR检测

根据已发表的文献资料^[13],合成GLRaV-1CP基因的检测引物:正向引物为5'-TCTTTACC-AACCCCGAGATGAA-3',反向引物为5'-GTGT-CTGGTGACGTGCTAAACG-3'。反转录体系及反应条件如下:4 μ L总RNA为模板,1 μ L反向引物,加入5.7 μ L DEPC水,混匀,70 $^{\circ}$ C水浴5 min,冰上放置5 min,再加入4 μ L 5 \times buffer、4 μ L dNTPs(各2.5 mmol/L)、0.5 μ L RNase抑制剂(40 U/ μ L)、0.8 μ L M-MLV反转录酶(200 U/ μ L),反转录反应总体系为20 μ L,于42 $^{\circ}$ C反应1 h合成cDNA。

PCR反应体系及条件如下:每25 μ L反应体系中,加入18.3 μ L ddH $_2$ O、2.5 μ L 10 \times Taq buffer、2 μ L dNTPs(2.5 mmol/L)、0.2 μ L ExTaq DNA聚合酶(5 U/ μ L)、0.5 μ L正向引物(20 μ mol/L)、0.5 μ L反向引物(20 μ mol/L)、1 μ L cDNA。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,54 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,40个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。将PCR原液送至北京擎科新业生物技术有限公司进行序列测定,并在NCBI上BLAST获得的国内外已报道的相关序列比对结果。

1.2.3 RT-PCR扩增GLRaV-1CP基因全序列

根据已报道的CP基因全序列,设计正向引物(5'-GATGGCTAGCGTTATATCTCA-3')和反向引物(5'-CACCGCAGTACAATATTACACC-3')。以1.2.2中2个样品的总RNA为模板,上述反向引物为反转录引物进行反转录合成cDNA。反转录反应体系和条件同1.2.2。

以cDNA为模板分别进行PCR。在每25 μ L PCR反应体系中,加入17.3 μ L ddH $_2$ O、2.5 μ L 10 \times ExTaq buffer、2 μ L dNTPs(2.5 mmol/L)、0.2 μ L ExTaq DNA聚合酶(5 U/ μ L)、上述正反向引物(20 μ mol/L)各0.5 μ L和2 μ L cDNA。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,53.5 $^{\circ}$ C退火

30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 产物回收及克隆

切胶回收 PCR 产物, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄青霉素(Ampicillin)的 LB 平板上随机挑取单菌落接到 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于摇床中 37 °C, 160 r/min 振荡培养过夜。取 1.5 mL 菌液用碱裂解法小量提取质粒, 经 PCR 筛选得阳性克隆, 并进行酶切鉴定。

1.2.5 序列测定与分析

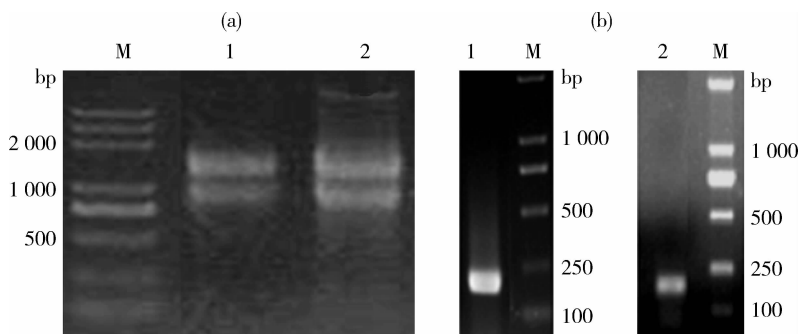
将阳性重组质粒的相应菌液送至北京擎科新业

生物技术有限公司进行序列测定。利用 DNAMAN 和 MEGA4 序列分析软件进行分析, 并与国外报道序列进行序列比较。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测 GLRaV-1

图 1(a)为提取的总 RNA, 图 1(b)为 RT-PCR 检测 GLRaV-1 的结果。从河北和辽宁样品中均扩增出大小 230 bp 左右的条带(图 1(b)泳道 1 和 2), 与预期结果相符。通过对阳性克隆序列测定和 Blast 分析表明, RT-PCR 检测结果为 GLRaV-1 CP 基因部分序列。



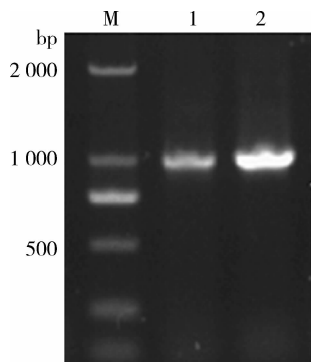
(a)为河北、辽宁的葡萄样品植物总 RNA; (b)为河北、辽宁样品 GLRaV-1 RT-PCR 检测结果

图 1 河北、辽宁样品植物总 RNA 和 GLRaV-1 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 Total RNA extraction(a) and RT-PCR detection of GLRaV-1(b)

2.2 CP 基因全序列扩增及序列分析

用特异性引物从这 2 个样品中扩增出大小约 1 000 bp 的条带(图 2)。通过对阳性克隆进行序列测定表明, 获得了 CP 基因全序列。GLRaV-1 CP 基因核苷酸长度为 969 nt, 编码 322 个氨基酸。将这 2 个分离物与 GenBank 中来自澳大利亚



泳道 1 和 2 分别为河北和辽宁分离物 CP 基因扩增结果。

图 2 GLRaV-1 CP 基因全序列 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 RT-PCR detection of complete sequence of GLRaV-1 CP gene

(GLRaV-1-AUS)、伊朗(GLRaV-1-IR-S7)和巴西(GLRaV-1-PS)分离物进行核苷酸和氨基酸的同源性比较(表 1), 并利用 MEGA4 软件构建系统进化树(图 3)。

表 1 GLRaV-1 分离物 CP 基因核苷酸与氨基酸序列同源性分析

Table 1 Identities of nucleotide and amino acid sequences of CP gene from different GLRaV-1 isolates %

同源性	分离物				
	AUS	IR-S7	PS	HB	LN
AUS		93.5	93.5	92.9	93.8
IR-S7	90.6		94.4	94.1	97.5
PS	90.8	90.0		95.7	94.7
HB	91.6	90.0	94.2		93.8
LN	90.6	96.0	90.7	90.7	

注: AUS、IR-S7、PS、HB 和 LN 分别为来自澳大利亚、伊朗、巴西、河北和辽宁分离物。表中对角线以下数字为核苷酸; 对角线以上为氨基酸。

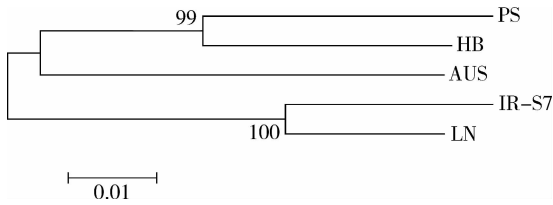


图 3 GLRaV-1 分离物 CP 基因核苷酸序列分析进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree from alignments of CP nucleotide sequences of 5 GLRaV-1 isolates

序列分析表明, GLRaV-1-HB 和 GLRaV-1-LN 的核苷酸同源率为 90.6%, 由此推导的氨基酸同源率为 93.8%; GLRaV-1-HB 与已报道的国外 3 个分离物 CP 全序列相比, 其核苷酸和氨基酸序列同源率分别为 90.0%~94.2% 和 92.9%~95.7%; GLRaV-1-LN 与已报道的国外 3 个分离物 CP 基因全序列相比, 其核苷酸和氨基酸序列同源率分别为 90.6%~96.0% 和 93.8%~97.5%。

从 CP 基因核苷酸序列分析的进化树(图 3)可知, 现有分离物可分为 3 组, 其中本研究的 GLRaV-1-HB 与巴西分离物 PS 为一组, GLRaV-1-LN 与伊朗分离物 IR-S7 为一组, 澳大利亚分离物 AUS 单独为一组。

3 讨论

GLRaV-1 基因组为正单链 RNA, 含有 10 个可读框, 从 5'-3' 方向分别编码包括 CP 和 HSP70h 等 10 个蛋白^[9], 其中 CP 和 HSP70h 基因序列通常用来进行 Closteroviridae 成员的遗传变异分析^[3]。OMiNEK 等^[14]利用部分 HSP70h 蛋白基因序列对来自捷克和斯洛伐克的 8 个 GLRaV-1 分离物进行了分析, 发现这些分离物可分成 2 组。本研究用目前国内外已有的 5 个 CP 基因全序列(包括本研究的 2 个分离物)构建遗传进化树, 发现由于 GLRaV-1-HB 与 GLRaV-1-LN 间的核苷酸和氨基酸同源性相对较低, 而分属于不同组。这个结果也暗示了 GLRaV-1 中国分离物间可能具有较高的遗传变异性。已有的工作结果表明 GLRaV-1 也是导致我国葡萄卷叶病的主要病毒种类之一(数据正在整理发表), 因此有必要进一步进行 GLRaV-1 中国分离物间的遗传变异分析, 从而提高其检测可靠性。

致谢 衷心感谢中国农业科学院果树研究所董雅凤老师、河北省怀来县林业局森防站何建斌站长在采样过程中提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Fuchs M, Martinson T E, Loeb G M, et al. Survey for three major leafroll disease-associated viruses in Finger lakes vineyards in New York[J]. Plant Disease, 2009, 93:395-401
- [2] Akbaş B, Kunter B, İlhan D. Influence of leafroll on local grapevine cultivars in agroecological conditions of central anatolia region[J]. Horticulture Science, 2009, 36(3):97-104
- [3] Martelli G P. Grapevine virology highlights 2006—2009[C]// Dijon. Extended Abstr. 16th Meet. France; ICVG, 2009:15-23
- [4] Beuve M, Sem'pe L, Lemaire O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 141(2):117-124
- [5] Maliogkka V I, Dovas C I, Katis N I. Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the *Ampelovirus* genus[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154:41-47
- [6] Jarugula S, Alabi O J, Martin R R, et al. Genetic variability of natural populations of grapevine leafroll-associated virus 2 in Pacific Northwest vineyards [J]. Phytopathology, 2010, 100(7):698-707
- [7] Zimmermann D, Bass P, Legin R, et al. Characterization and serological detection of four closterovirus like particles associated with leafroll disease of grapevine[J]. Phytopathol, 1990, 130:205-218
- [8] Akbaş B, Kunter B, İlhan D. Occurrence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses 1, 2, 3 and 7 in Turkey [J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155:122-124
- [9] Little A, Fazeli C F, Rezaian M A. Hypervariable genes in grapevine leafroll associated virus 1[J]. Virus Research, 2001, 80(1/2):109-116
- [10] Fazeli C F, Rezaian M A. Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs [J]. Journal of General Virology, 2000, 81:605-615
- [11] 裴光前, 董雅凤, 张尊平, 等. 4 种葡萄卷叶伴随病毒多重 RT-PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1):21-26
- [12] 王萌, 费菲, 程玉琴, 等. 葡萄卷叶伴随病毒 2 号和 3 号辽宁分离物部分基因组的序列分析[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5):458-465
- [13] Oman F, Rwhani A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (Taq-Man)[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 133:130-136
- [14] Kominek P, Glasa M, Bryxiava M. Analysis of the molecular variability of grapevine leafroll-associated virus reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines[J]. Virus Genes, 2005, 31(3):247-255