

我国部分苹果产区苹果锈果类病毒的检测和全序列分析

陈冉冉, 谢吉鹏, 叶婷, 董云浩, 国立耘*, 周涛*

(中国农业大学植物病理学系, 北京 100193)

摘要 近年来,由苹果锈果类病毒 *Apple scar skin viroid* (ASSVd)引起的苹果花脸病、锈果病在我国一些苹果产区日趋严重,对我国苹果生产和苹果产业发展造成严重危害。为了解 ASSVd 在我国一些苹果产区的发生和变异情况,采用 RT-PCR 对陕西、山东、山西、河北、北京和黑龙江 6 个苹果产区的 35 份苹果样品进行检测,并克隆获得 30 个分离物的基因组全序列,大小为 330~333 个核苷酸。分析表明,这些分离物的基因组全序列与 GenBank 中 ASSVd 基因组核苷酸序列相似度为 96%~100%,在苹果锈果类病毒属的末端保守区及中央保守区保守,在致病区和左端区域有突变,一些分离物的突变位点相同。系统发育分析表明分离物因相同的突变位点而聚类,而与地理来源无关。

关键词 苹果; 苹果锈果类病毒; RT-PCR; 变异分析; 系统发育

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.015

Detection and full nucleotide sequences analysis of *Apple scar skin viroid* isolates in some apple producing areas of China

Chen Ranran, Xie Jipeng, Ye Ting, Dong Yunhao, Guo Liyun, Zhou Tao

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

Abstract In recent years, dappling, scarring and malformation on apple fruits caused by *Apple scar skin viroid* (ASSVd) is increasing and seriously affects apple production and apple industry development in China. To understand the occurrence and variations of ASSVd in apple production regions of China, 35 samples were collected from six major apple producing areas including Shaanxi, Shandong, Shanxi, Hebei, Beijing and Heilongjiang provinces. Reverse transcription-PCR and sequence analysis showed that 30 isolates of ASSVd were obtained with genome sizes of 330–333 nucleotides, which had 96%–100% identities with sequences of ASSVd in GenBank, and had conserved terminal conserved region (TCR) and central conserved region (CCR). Mutations were found in pathogenic region and terminal left region. Interestingly, same mutation sites were found in some isolates. Phylogenetic analysis showed that these isolates clustered due to mutation sites on ASSVd genome while no relation to geographical origins.

Key words apple; *Apple scar skin viroid*; RT-PCR; variation analysis; phylogenesis

苹果是我国重要的栽培果树,其栽培面积和产量居世界首位^[1]。由病毒和类病毒引起的苹果病害在我国苹果产区发生普遍,已经成为影响苹果产量和质量的重要因素^[2]。苹果锈果类病毒 *Apple scar skin viroid* (ASSVd)是马铃薯纺锤块茎类病毒科 *Pospiviroidae* 苹果锈果类病毒属 *Apscarviroid* 成员^[3]。1985年我国学者陈炜等在国内首次报道了

ASSVd^[4]。1987年 Hashimoto 等发表了 ASSVd 的基因组全序列^[3]。ASSVd 基因组为一条环状的单链 RNA,全长约 330 个核苷酸^[3],具有 5 个功能区,形成稳定的杆状或拟杆状的二级结构^[5]。有研究发现类病毒的保守区域与复制密切相关^[6-7],RNA 的缺失、插入、替换主要发生在致病区和可变量区^[8]。关于变异位点对 ASSVd 致病性的影响尚无

收稿日期: 2016-11-22

修订日期: 2017-01-20

基金项目: 国家现代农业(苹果)产业技术体系(nycytx-08-04-02); 国家公益性行业(农业)科研专项(201203076-02)

* 通信作者 E-mail: ppguo@cau.edu.cn; taozhoucau@cau.edu.cn

明确数据,需进一步研究。目前发现 ASSVd 可侵染苹果^[9]、梨^[10]、桃^[11]、杏^[12]和野樱桃^[13]等植物。植株一旦感染 ASSVd,终生带毒,果树幼树期不出现病症,结果后病症显现,果实的食用价值和商品价值大为降低。

当前我国苹果产业发展迅速,苗木需求量大,因苗木的调运和无性材料的快繁等因素,ASSVd 的发生呈加重趋势,在苹果生产中造成的危害日益严重^[2]。为研究 ASSVd 在我国一些苹果产区的发生和变异情况,本文对采自我国 6 个苹果产区的 35 份苹果样品进行检

测,克隆得到 30 个 ASSVd 分离物的全序列,通过对全序列的比对分析,发现了一些相同的变异位点,为研究 ASSVd 的变异和进化提供了新的数据。

1 材料和方法

1.1 苹果样品

2011 年—2016 年在陕西、山东、山西、河北、北京和黑龙江的苹果产区采集有症状的苹果果实样品和无明显症状的枝条样品,共 35 份(表 1)。样品整理后保存于 4℃和-20℃。

表 1 样品基本信息

Table 1 Information of samples

编号 Number	采集时间/年—月 Sampling time	采集地点 Sampling site	品种 Variety	采样部位 Tissue	样品症状表现 Symptom on sample
xa-1	2011—11	陕西西安	短枝礼富	枝条	枝条无明显症状(叶片花叶)
xa-4	2011—11	陕西西安	短枝礼富	枝条	枝条无明显症状(果实花脸)
sxqy-1	2015—09	陕西千阳	未知	枝条	枝条无明显症状
sxqy-2	2015—09	陕西千阳	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-1	2012—07	山东青岛	SH38	枝条	枝条无明显症状(果实花脸)
qd-2	2012—07	山东青岛	SH38	枝条	枝条无明显症状(果实花脸)
yt-1	2012—11	山东烟台	富士	果实	果实花脸
qd-3	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-4	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-5	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-6	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-7	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
qd-8	2015—09	山东青岛	未知	枝条	枝条无明显症状
sx-1	2016—04	山西	瑞阳	枝条	枝条无明显症状
sx-5	2016—04	山西	瑞阳	枝条	枝条无明显症状
sx-8	2016—04	山西	瑞阳	枝条	枝条无明显症状
sx-14	2016—04	山西	瑞阳	枝条	枝条无明显症状
hb-3	2012—11	河北	未知(砧木)	枝条	枝条无明显症状
hb-6	2012—11	河北	未知(砧木)	枝条	枝条无明显症状
hb-7	2012—11	河北	未知(砧木)	枝条	枝条无明显症状
hb-8	2012—11	河北	未知(砧木)	枝条	枝条无明显症状
hb-12	2012—11	河北	未知(砧木)	枝条	枝条无明显症状
shz2-1	2012—11	北京三合庄	富士	果实	果实花脸
cp-1	2012—11	北京昌平	富士	果实	果实锈果
cp-2	2012—11	北京昌平	富士	果实	果实花脸
mdj-2	2011—09	黑龙江牡丹江	金红 123	果实	果实着色不匀
mdj-11	2011—09	黑龙江牡丹江	龙丰	果实	果实着色不匀
mdj-12	2011—09	黑龙江牡丹江	金红 123	果实	果实花脸
mdj-13	2011—09	黑龙江牡丹江	龙冠	果实	果实畸形
592—02	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状
592—03	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状
592—08	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状
592—10	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状
592—20	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状
592—22	2015—11	黑龙江牡丹江	山丁子	枝条	枝条无明显症状

1.2 方法

1.2.1 植物总 RNA 的提取

取 0.1~0.2 g 样品(叶片,枝条韧皮部或果皮)用 SiO₂ 吸附法^[14]进行植物总 RNA 提取。提取的 RNA 直接反转录或-80℃保存备用。

1.2.2 RT-PCR 检测

反转录体系为 20 μL:2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL,5×M-MLV Buffer 4 μL,M-MLV(40 U/μL)0.5 μL,RNase inhibitor(40 U/μL)0.5 μL、随机六聚体引物和 Oligo(dT)引物各 0.5 μL、植物总 RNA 3.5 μL,用 DEPC 水补足至 20 μL,42℃水浴反应 1 h,产物直接进行 PCR 或-20℃保存备用。

参照报道的扩增 ASSVd 全基因组序列的引物(正向引物:5'-CCGGTGAGAAAGGAGCTGC-CAGCA-3';反向引物:5'-CCTTCGTCGACGACG-ACAGGTGAG-3')^[5]进行 PCR。PCR 反应体系为 25 μL:2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.25 μL,正、反向引物各 0.5 μL,反转录产物 2.0 μL,用 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应循环参数:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,67℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。4℃保存。PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.3 PCR 产物克隆和测序分析

在紫外灯下切下含有目的片段的琼脂糖凝胶,使用普通 DNA 凝胶回收试剂盒对扩增产物进行回收纯化。将纯化的 PCR 产物连接至克隆载体 pMD19-T(simple)上,转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,筛选单菌落于 800 μL 含氨苄青霉素(50

μg/mL)的 LB 培养基中培养,通过菌液 PCR 验证鉴定重组质粒,每个样品筛选 3 个阳性菌液送至北京六合华大基因科技有限公司进行序列测定。

1.2.4 序列比对和系统进化分析

用 DNAMAN 软件对所得基因序列进行分析。通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)比对分析目的片段。序列对比运用 DNAMAN 软件和 Multalin 在线软件^[15]进行,以 GenBank 中 ASSVd 标准序列(NC_001340.1)为对比序列。进化树构建运用 ClustalX 和 MEGA 6.06 的邻接法(neighbor-joining)进行,重复次数为 1 000,以 GenBank 中 ASBVd(NC_001410)、PSTVd(NC_002030)和 ADFVd(NC_003463.1)标准序列作为外组对照,其中 ASBVd 作为不同科的外组对照,PSTVd 作为不同属的外组对照,ADFDVd 作为同属的外组对照。

2 结果与分析

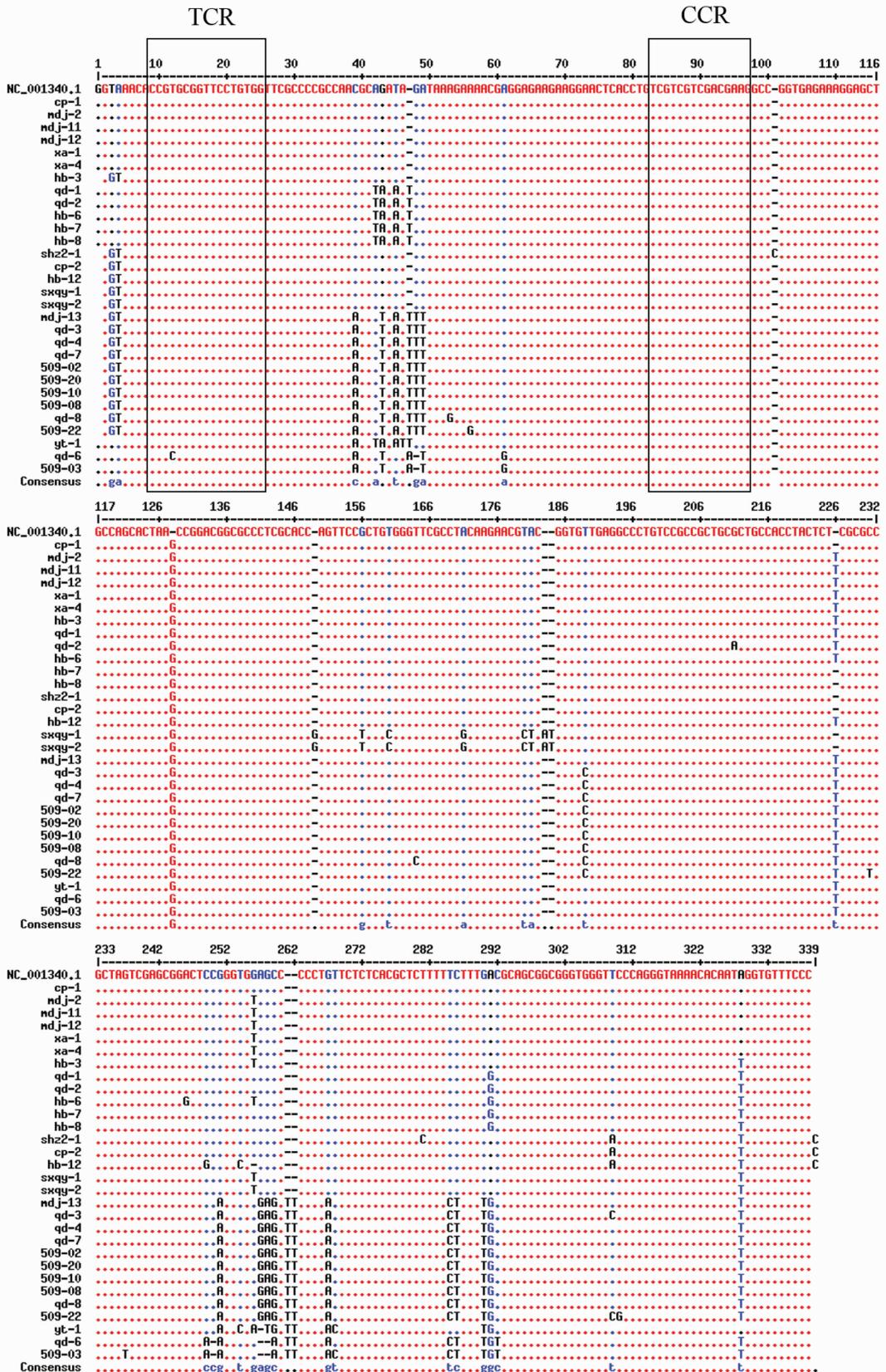
2.1 ASSVd 检测结果

RT-PCR 检测结果表明,从采自陕西的 4 份样品(sxqy-1,sxqy-2,xa-1 和 xa-4),采自山东的 8 份样品(qd-1,qd-2,yt-1,qd-3,qd-4,qd-6,qd-7 和 qd-8),采自河北的 5 份样品(hb-3,hb-6,hb-7,hb-8 和 hb-12),采自北京的 3 份样品(shz2-1,cp-1 和 cp-2)和采自黑龙江的 10 份样品(mdj-2,mdj-11,mdj-12,mdj-13,592-02,592-03,592-08,592-10,592-20,592-22)中均检测到 330 bp 左右的特异片段,与 ASSVd 阳性对照样品检出的条带一致,表明样品被 ASSVd 侵染。ASSVd 的检测结果如表 2 所示。

表 2 RT-PCR 检测苹果样品中 ASSVd 结果

Table 2 Results summary of detection of ASSVd in apple samples using RT-PCR

采样地点 Collection site	检测样品数/个 Number of samples	ASSVd 阳性样品数/个 Number of positive samples	阳性检出率/% Detection rate
陕西 Shaanxi	4	4	100
山东 Shandong	9	8	88.9
山西 Shanxi	4	0	0
河北 Hebei	5	5	100
北京 Beijing	3	3	100
黑龙江 Heilongjiang	10	10	100
合计 Total	35	30	85.7



NC_001340.1为ASSVd标准序列作为对照;黑框表示苹果锈类病毒属成员的两个保守区域

NC_001340.1 is ASSVd reference sequence as a control; Black boxes represent two conservative regions of apscarviroid

图1 我国部分苹果产区30个ASSVd分离物基因组核苷酸序列比对

Fig. 1 Multiple genome sequences alignment of 30 ASSVd isolates from some apple production areas in China

2.2 ASSVd 分离物序列测定与变异分析

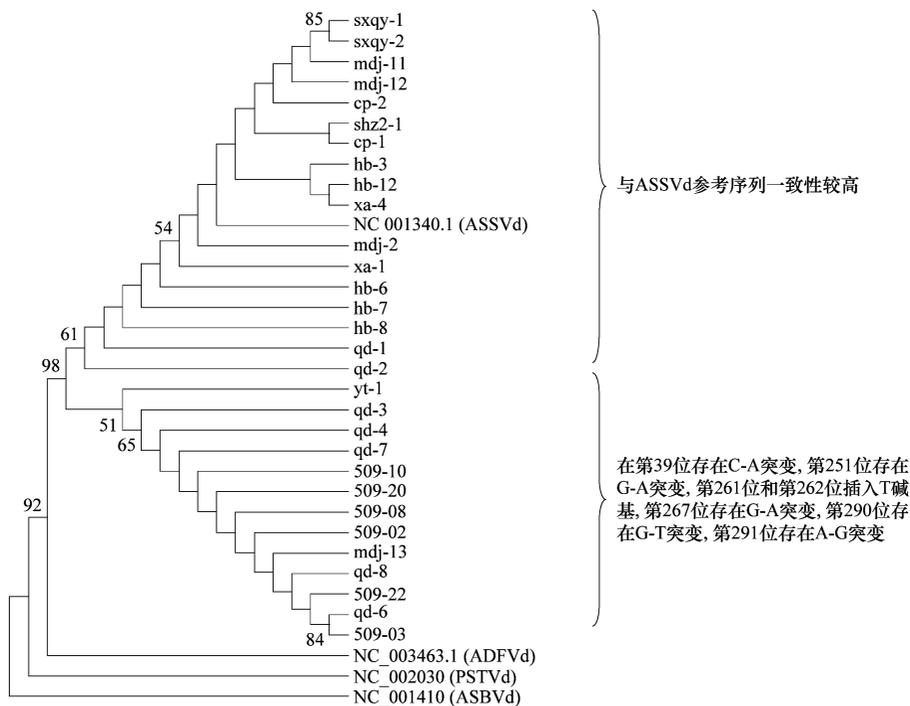
将 30 个样品的 PCR 产物克隆测序,结果表明所有片段的长度均为 330~333 nt。序列比对结果表明,扩增得到的 30 个片段与 GenBank 中 ASSVd 基因组核苷酸序列一致性为 96%~100%,表明这些片段均为 ASSVd 基因组序列。其中样品 xa-1, xa-4, mdj-2, mdj-11 和 mdj-12 扩增获得的 ASSVd 序列与登录号为 AF421195.1 的核苷酸序列一致性均为 100%;样品 cp-1, cp-2 和 shz2-1 扩增得到的 ASSVd 序列与登录号为 AY972082.1 的核苷酸序列一致性分别为 100%,99%和 98%;样品 qd-1, qd-2, hb-6, hb-7 和 hb-8 扩增获得的 ASSVd 序列与登录号为 HQ326093.1 的核苷酸序列一致性均为 99%;样品 qd-3, qd-7, 592-02, 592-08, 592-10, 592-20, qd-8 和 qd-4 扩增得到的 ASSVd 序列与登录号为 KC110860.1 的核苷酸序列一致性分别为 99%,99%,99%,99%,99%,99%,98%和 96%;样品 592-03 扩增出的 ASSVd 序列与登录号为 HQ840722.1 的核苷酸序列一致性为 98%;从样品 yt-1 扩增出的 ASSVd 序列与登录号为 KC110858.1 的核苷酸序列一致性为 97%;从样品 mdj-13, 592-22 和 qd-6 扩增出的 ASSVd 序列与登录号为 KU507023.1 的核苷酸序列一致性分别为

99%,98%和 96%;从样品 hb-3, hb-12, sxqy-1 和 sxqy-2 扩增出的 ASSVd 序列与登录号为 KP765428.1 的核苷酸序列一致性分别为 98%,98%,97%和 97%。以样品编号命名上述 ASSVd 分离物。

以 GenBank 中 ASSVd 标准序列(NC_001340.1)为对比序列,运用 Multalin 在线软件比对所有 30 个分离物的基因组序列,结果如图 1 所示。所有 30 条序列及 ASSVd 标准序列(NC_001340.1)在苹果锈果类病毒属的末端保守区(TCR)及中央保守区(CCR)两个保守区保守,只有 qd-6 分离物在第 12 位有 T-A 突变。变异位点集中在致病区(P 区)与左末端区(TLR)交界处。进一步分析不同分离物的序列,发现分离物 xa-1, xa-4, sxqy-1, sxqy-2, qd-1, qd-2, hb-3, hb-6, hb-7, hb-8, hb-12, cp-1, cp-2, shz2-1, mdj-2, mdj-11 和 mdj-12 与参考序列一致性较高;分离物 yt-1, qd-3, qd-4, qd-6, qd-7, qd-8, mdj-13, 509-02, 509-03, 509-08, 509-10, 509-20 和 509-22 在第 39 位存在 C-A 突变,第 251 位存在 G-A 突变,第 261 位和第 262 位插入 T 碱基,第 267 位存在 G-A 突变,第 290 位存在 G-T 突变,第 291 位存在 A-G 突变。

2.3 系统进化分析

进化树分析结果如图 2 所示。



NC_001340.1为ASSVd标准序列; NC_001410为ASBVd标准序列作为不同科外组对照; NC_002030为PSTVd标准序列作为同科不同属外组对照; NC_003463.1为ADFVd标准序列作为同属外组对照

NC_001340.1 is ASSVd reference sequence. NC_001410 is ASBVd reference sequence as an outside that belongs to the same group control in different family. NC_002030 is PSTVd reference sequence as an outside that belongs to the same group control in different genus. NC_003463.1 is ADFVd reference sequences as an outside that belongs to the same group control in the same genus

图 2 我国部分苹果产区 ASSVd 分离物系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of genomic sequences of ASSVd isolates from some apple production areas in China

30 个分离物按突变位点的不同聚为 2 组, 聚集与地理来源无关。与 ASSVd 参考序列一致性高的分离物 xa-1, xa-4, sxqy-1, sxqy-2, qd-1, qd-2, hb-3, hb-6, hb-7, hb-8, hb-12, cp-1, cp-2, shz2-1, mdj-2, mdj-11 和 mdj-12 聚为一组; 分离物 yt-1, qd-3, qd-4, qd-6, qd-7, qd-8, mdj-13, 509-02, 509-03, 509-08, 509-10, 509-20 和 509-22 聚为一组。这些组与外组对照分区明显。

3 讨论

近年来, ASSVd 在我国苹果产区的发生率逐年增加, 若不及时、正确地防控, 将对我国苹果产业造成严重危害。本研究采集我国 6 个苹果产区的疑似被 ASSVd 侵染的苹果果实样品和一些无症状的枝条样品 35 份, 利用 RT-PCR 方法进行 ASSVd 检测, 结果表明, 采自陕西、山东、河北、北京及黑龙江的苹果样品检测到 ASSVd, 样品的阳性检出率为 88.9%~100%。这些数据表明我国一些苹果产区有 ASSVd 发生。将来的工作将在更广地区采集更多样品进一步调查我国苹果产区的 ASSVd 发生情况。

本研究成功克隆了 30 个 ASSVd 分离物的基因组全序列, 序列比对结果表明这些序列含有相同的保守区域 (CCR 和 TCR)。变异位点集中在致病区域和可变区域, 这与之前的研究发现类病毒 RNA 的缺失、插入、替换主要发生在致病区和可变区的结果一致^[8]。关于变异位点对 ASSVd 致病性的影响尚无明确数据, 需进一步研究。进化树分析表明所有 30 条 ASSVd 序列聚集成两组, 并且分离物因相同的变异位点而分组聚类。变异位点分析表明来自同一品种的分离物亦无特异性变异, 同一地理来源的分离物无特异性变异, 其中黑龙江的‘山丁子’样品和山东部分样品存在相同的变异位点, 推测这可能与苗木的调运和接穗的随意嫁接有关。

鉴于 ASSVd 的发生对我国苹果生产造成严重危害, 并有逐年加重的趋势, 应及时采取防控措施, 切断 ASSVd 传播源头, 尽早更换病树。ASSVd 的传播途径主要有种子^[16]、带毒枝条嫁接以及修剪工具导致的污染传播^[17]。因为目前无有效的防治药剂, 因此防控 ASSVd 的根本措施应以预防为主, 选用无毒苗木。

参考文献

- [1] 杨振锋, 丛佩华, 聂继云, 等. 我国苹果产业现状、存在问题及建议[J]. 北方果树, 2006(5): 34-36.
- [2] 郝璐, 叶婷, 陈善义, 等. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 158-161.
- [3] Hashimoto J, Koganezawa H. Nucleotide sequence and secondary structure of *Apple scar skin viroid* [J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(17): 7045-7052.
- [4] 陈炜, 田波. 苹果锈果病组织中发现的类病毒 RNA [J]. 科学通报, 1985, 30(17): 1360.
- [5] Hadidi A, Huang C, Hammond R W, et al. Homology of the agent associated with dapple apple disease to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids [J]. Phytopathology, 1990, 80(3): 263-268.
- [6] Baumstark T, Schroder A R, Riesner D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(3): 599-610.
- [7] Gas M E, Hernández C, Flores R, et al. Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations [J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(11): 1813-1826.
- [8] Kyriakopoulou P E, Osaki H, Zhu Shuifang, et al. *Apple scar skin viroid* in pear [M]// Hadidi A, Flores R, Randles J W. Viroids. Australia: CSIRO Publishing, 2003: 142-145.
- [9] Puchta H, Luckinger R, Yang X C, et al. Nucleotide sequence and secondary structure of *Apple scar skin viroid* (ASSVd) from China [J]. Plant Molecular Biology, 1990, 14(6): 1065-1067.
- [10] Kyriakopoulou P E, Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with *Apple scar skin viroid* in Greece [J]. Acta Horticulturae, 1998(472): 617-625.
- [11] 赵英, 牛建新. 新疆桃树上苹果锈果类病毒 (ASSVd) 的检测与全序列分析 [J]. 果树学报, 2008, 25(2): 274-276.
- [12] Zhao Ying, Niu Jianxin. Apricot is a new host of *Apple scar skin viroid* [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2008, 3(1): 98-100.
- [13] Walia Y, Dhir S, Bhadoria S, et al. Molecular characterization of *Apple scar skin viroid* from Himalayan wild cherry [J]. Forest Pathology, 2012, 42: 84-87.
- [14] 董雅凤, 张尊平, 杨俊玲, 等. 葡萄卷叶病毒 3 RT-PCR 检测技术研究 [J]. 中国果树, 2005(6): 9-12.
- [15] Walia Y, Kumar Y, Rana T, et al. Molecular characterization and variability analysis of *Apple scar skin viroid* in India [J]. Journal of General Plant Pathology, 2009, 75: 307-311.
- [16] 梁成林, 赵玲玲, 宋来庆, 等. 几种苹果实生砧木种子传毒潜力检测 [J]. 果树学报, 2014, 31(6): 1164-1169.
- [17] 白海霞, 高彦, 贾少武, 等. 选用苹果无毒苗木防控病毒病危害 [J]. 西北园艺(果树), 2015(3): 13-15.

(责任编辑: 杨明丽)