

# 葡萄卷叶相关病毒 13 在我国葡萄上的首次报道

范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 董雅凤\*

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 兴城 125100)

First report of *Grapevine leafroll-associated virus 13* in grapevines in China FAN

XU-dong, ZHANG Zun-ping, REN Fang, HU Guo-jun, DONG Ya-feng\* (National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Tree, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Xingcheng 125100, China)

**Abstract:** *Grapevine leafroll-associated virus 13* (GLRaV-13) was reported in Japan in 2016 as a new member of genus *Ampelovirus*, and have not yet been found in other countries. In this study, we adopted small RNA sequencing to detect potential viruses in an amur grape cultivar “Zuoshan II” exhibiting chlorotic mottling. By assembling the obtained small RNAs, 112 contig sequences showed 87.5%-100% nucleotide identity and 64.9% coverage with the Japanese GLRaV-13 isolate a177 (GenBank ID: NC\_029783). Two sets of primers, designed from the contig sequences, were used to amplify the *cp* and *hsp70h* gene sequences of the GLRaV-13 isolate, and the sequencing results showed the obtained sequences were the specific fragments of GLRaV-13. In addition, thirty amur grapevines and 90 other grapevines were used to detect GLRaV-13 using two pairs of primers, and the results showed that only amur grapevines tested positive for GLRaV-13. This is the first report of GLRaV-13 in China, and the study could help improve the sanitary status of grape cultivars in China.

**Key words:** *Grapevine leafroll-associated virus 13* (GLRaV-13); small RNA sequencing; detection; sequence analysis

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)01-0141-04

我国葡萄品种资源丰富,栽培面积逐年增加。葡萄感染病毒后,便终生带毒,持续危害,造成生长发育迟缓,树势衰退,严重影响葡萄的产量和品质。山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)是我国重要的野生果树资源,其抗病能力较强,是培育抗病、抗寒优良品种的珍贵种质。山葡萄浆果营养物质丰富,是酿造葡萄酒的优质原料<sup>[1,2]</sup>。伴随山葡萄产业的不断发展,对其病毒病的调查研究显得尤为重要。

葡萄卷叶相关病毒 13(*Grapevine leafroll-associated virus 13*, GLRaV-13)为 2016 年日本报道的一个新病毒,其全长为 17 608 nt,包含 11 个开放

阅读框,根据其基因组结构及聚类分析,将该病毒划分为葡萄卷叶病毒属(*Ampelovirus*)的一个新成员<sup>[3]</sup>。GLRaV-13 是从一个表现葡萄卷叶病的葡萄样品中(编号为 a177)获得,由于该样品同时携带葡萄卷叶相关病毒 3(*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3),因此,尚不能确定 GLRaV-13 的致病性。本文采用小 RNA 测序技术对表现褪绿斑驳的“左山二”葡萄进行深度测序,在我国首次发现 GLRaV-13。采用 RT-PCR 方法对 121 个葡萄样品进行了 GLRaV-13 检测,旨在进一步研究 GLRaV-13 在我国的发生及危害情况。

收稿日期: 2018-05-16; 修回日期: 2018-07-20; 网络出版时间: 2018-07-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180727.1707.001.html>

基金项目: 国家葡萄产业技术体系建设项目(CARS-29-bc-1)

通讯作者: 董雅凤, 研究员, 主要从事落叶果树病毒研究; Tel: 0429-3598278, E-mail: yfdong@163.com

第一作者: 范旭东, 助理研究员, 主要从事落叶果树病毒研究; E-mail: fxd82@sina.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料均种植在中国农科院果树研究所国家落叶果树中心试材保存圃(辽宁兴城)。用于小 RNA 测序的“左山二”葡萄样品,表现明显的系统性褪绿斑驳症状。采集的葡萄叶片样品液氮速冻,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。为明确 GLRaV-13 的侵染状况,选择 30 个山葡萄样品(测序的样品作为阳性对照)及 90 个其他葡萄样品(包括来源 10 个省份的 30 个品种),进行 GLRaV-13 的 RT-PCR 检测。山葡萄样品包括左山一(12 个)、双优(8 个)、双红(7 个)、左山二(3 个)。山葡萄样品均为中国自主培育的品种,最初的样品来源于吉林长春。

### 1.2 小 RNA 测序及分析

将表现症状的葡萄叶片干冰运至北京百迈克生物科技有限公司,委托其进行小 RNA 深度测序。原始数据过滤、小 RNA 组装及 Blast 比对参照文献[4]报道的方法进行。

### 1.3 RNA 提取及反转录

RNA 提取的具体操作步骤见参考文献[5]。反转录在 1.5 mL 灭菌离心管中进行,依次加入灭菌纯水 7.0  $\mu\text{L}$ 、6 bp 随机引物( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )(上海生工生物工程技术服务公司合成) 1.0  $\mu\text{L}$ ,总 RNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,离心混匀, $95^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,冰上放置 2 min;加入 5 $\times$ M-MLV buffer 5.0  $\mu\text{L}$ 、10 mmol  $\cdot$   $\text{L}^{-1}$  dNTPs 1.5  $\mu\text{L}$ 、200 U  $\cdot$   $\text{mL}^{-1}$  M-MLV 逆转录酶 0.8  $\mu\text{L}$ 、灭菌纯水 2.7  $\mu\text{L}$ , $37^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, $42^{\circ}\text{C}$  50 min, $70^{\circ}\text{C}$  5 min。合成的 cDNA 立即进行 PCR 扩增或者放 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.4 PCR 扩增

根据小 RNA 拼接获得的 GLRaV-13 序列设计

两对引物(表 1),分别用于扩增 GLRaV-13 的 *cp* 和 *hsp70h* 基因序列。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,含 10 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、10 mmol  $\cdot$   $\text{L}^{-1}$  dNTPs 0.5  $\mu\text{L}$ 、10 mmol  $\cdot$   $\text{L}^{-1}$ 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ 、5 U  $\cdot$   $\text{mL}^{-1}$  Taq 酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、模板 cDNA 2.5  $\mu\text{L}$ 、灭菌纯水 18  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: $95^{\circ}\text{C}$  5 min; $95^{\circ}\text{C}$  40 s, $55^{\circ}\text{C}$  40 s, $72^{\circ}\text{C}$  50 s(*cp* 基因)或 1 min 20 s(*hsp70h* 基因),循环 35 次; $72^{\circ}\text{C}$  7 min; $4^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

### 1.5 克隆测序及序列分析

PCR 产物采用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒进行回收纯化。取 4  $\mu\text{L}$  纯化的 DNA 与零背景 TOPO TA 克隆试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)中的 10 $\times$ Enhancer buffer 0.5  $\mu\text{L}$  和 pTOPO-T 载体 0.5  $\mu\text{L}$  混匀,室温连接 5 min 后,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞,均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养皿上, $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜。挑取单克隆菌落进行菌液培养,并通过 PCR 鉴定获得阳性的重组质粒,每个分离物至少选 3 个阳性的重组质粒送北京诺赛基因组研究中心进行测序。采用 DNASTar 软件对测序结果进行核苷酸和氨基酸同源性比对。

## 2 结果

### 2.1 小 RNA 测序

原始数据和过滤后数据(Clean data)中的小 RNA 数分别为 23、392、877 和 17、882、782。对 Clean data 中小 RNA 进行拼接,并与病毒、类病毒数据库进行 Blast 比对,结果显示左山二葡萄样品中存在 GLRaV-13 的基因序列,未发现其他病毒的特异性序列。拼接获得的 GLRaV-13 序列共 112 条,对应 GLRaV-13 分离物 a177 (GenBank 登录号:NC\_029783)基因组的覆盖率为 64.9% (11420/17608),同源性为 87.5%~100%。

Table 1 The primers for the amplification of GLRaV-13

Primer	Sequence(5'-3')	Gene	Size/bp
GL13CP13528-1a	TCGTCAGGAATGGTACAGCCG	<i>cp</i>	597
GL13CP14124-1b	GCGCCAAAACCTTCTGATTCCG		
GL13HSP10663-1a	AACAGAGGCGGAGACTCAGAC	<i>hsp70h</i>	1 204
GL13HSP11864-1a	AGTCTTAGGCCACCCAACGTC		

## 2.2 左山二葡萄 GLRaV-13 的 PCR 鉴定

采用引物 GL13CP13528-1a/1b 和 GL13HSP-10663-1a/1b 分别对上述测序样品中的 GLRaV-13 进行 RT-PCR 扩增,分别获得 597 bp 和 1 204 bp 的目的片段(图 1)。对目的片段进行回收、克隆及测序,结果显示获得的 *cp* 基因序列与已报道 GLRaV-13 分离物 a177 的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 96% 和 100%, *hsp70h* 基因序列的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 95% 和 99%。获得序列的 GenBank 登录号分别为 MH347901 和 MH347905。

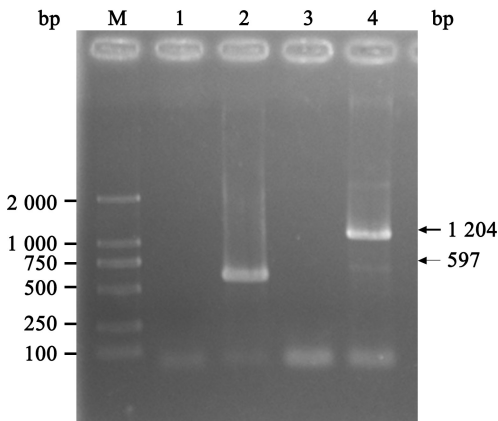


Fig. 1 PCR amplification results of GLRaV-13 *cp* and *hsp70h* gene sequences

M: DL2000; 1, 3: CK (-); 2: *cp* gene; 4: *hsp70h* gene.

## 2.3 GLRaV-13 的 RT-PCR 检测及序列分析

采用上述两对引物对 30 个山葡萄样品和 90 个毒源圃保存的葡萄样品进行了 PCR 检测,检测结果表明 GLRaV-13 仅在山葡萄样品中检出,在山葡萄上的检出率为 56.7% (17/30)。引物 GL13CP13528-1a/1b 的检出率 (56.7%, 17/30) 高于 GL13HSP10663-1a/1b 的检出率 (46.7%, 14/30)。其中,山葡萄品种左山一和左山二的 GLRaV-13 检出率均为 100%,双红的检出率为 28.6% (2/7),双优葡萄未检测到 GLRaV-13。对从左山一、左山二及双红葡萄获得的 PCR 产物进行回收、克隆及测序,并将获得的 10 条 CP 基因序列 (GenBank 登录号:MH347895~MH347904) 与日本分离物 a177 的 CP 基因序列一起进行同源性分析,结果表明中国山葡萄 GLRaV-13 分离物之间 CP 基

因核苷酸序列同源性较高,为 98.5%~100%,而中国山葡萄分离物与日本分离物 a177 的核苷酸序列同源性相对较低,为 95.8%~96.1%。

## 3 讨论

随着山葡萄新品种的不断涌现与推广,其潜在的经济价值,促进了山葡萄产业的快速发展。然而,山葡萄病毒病对该产业健康发展的影响不容忽视。本研究是继日本之后, GLRaV-13 在中国的首次发现。我们前期采用小 RNA 测序检测的田间葡萄样品为多种病毒复合侵染<sup>[4, 6]</sup>,而本研究检测的左山二葡萄仅携带 GLRaV-13,不携带任何已知的葡萄病毒及类病毒,推测该症状的发生可能与 GLRaV-13 侵染密切相关。有研究表明,葡萄卷叶病毒通常与葡萄卷叶病发生相关,而本研究并未观察到左山二葡萄样品表现明显的卷叶病症状,仅发现其叶片出现红斑,而未反卷。有关 GLRaV-13 的发生与症状的关系还需进一步研究。

本研究结果显示仅山葡萄样品能够检测到 GLRaV-13,且 GLRaV-13 在山葡萄中具有较高的检出率 (58.1%),表明 GLRaV-13 可能仅在我国山葡萄样品中发生和危害。为防止该病毒进一步扩散,对山葡萄及山葡萄选育的新品种苗木进行病毒筛查十分必要。本研究结果显示山葡萄 GLRaV-13 分离物之间的基因序列同源性较高,而与日本分离物的基因序列同源性较低,表明中国 GLRaV-13 山葡萄分离物与日本 GLRaV-13 a177 分离物具有相对较远的遗传进化关系,这丰富了 GLRaV-13 的分离物种类信息,为 GLRaV-13 遗传进化及起源研究提供了依据。

## 参考文献

- [1] Cui C W, Liu L Y, Wang H, *et al.* Progress in comprehensive utilization of *Vitis amurensis* Rupr (in Chinese) [J]. Food Science (食品科学), 2015, 36(13): 276-282.
- [2] Song H F, Liu H S, Yang Y M, *et al.* Screening of universal DNA barcodes for *Vitis amurensis* (in Chinese) [J]. Chinese Bulletin of Botany (植物学报), 2017, 52(6): 723-732.
- [3] Ito T, Nakaune R. Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine

- leafroll-associated virus 13 [J]. Archives of Virology, 2016, 161(9): 2555-2559.
- [4] Fan X D, Hong N, Zhang Z P, *et al.* Identification of a divergent variant of *Grapevine berry inner necrosis virus* in grapevines showing chlorotic mottling and ring spot symptoms [J]. Archives of Virology, 2016, 161(7): 2025-2027.
- [5] Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, *et al.* Molecular identification and gene sequence analysis of *Grapevine virus E* (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2014, 44(5): 455-460.
- [6] Fan X D, Zhang Z P, Ren F, *et al.* First report of grapevine fabavirus in grapevines in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 847.

责任编辑:于金枝

## 欢迎订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2018 年版)统计结果,《植物病理学报》影响因子 0.646。荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖、2012 中国国际影响力优秀学术期刊奖和 2014 年百种中国杰出学术期刊奖。

本刊为双月刊,每期定价 50 元,全年 6 期共 300 元。

邮发代号:82-214。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 406 室

邮编:100193

电话:(010) 6273 2364

E-mail:zwblxb@cau.edu.cn。