

葡萄浆果内坏死病毒变种类型 1 分离物 全长基因组序列分析

范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 李正男, 张双纳, 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)

Complete genome sequence analysis of *Grapevine berry inner necrosis virus* type 1 isolate FAN Xu-dong, ZHANG Zun-ping, REN Fang, HU Guo-jun, LI Zheng-nan, ZHANG Shuang-na, 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 berry inner necrosis virus* (GINV) recently reported in China can cause chlorotic mottling and ring spot on leaves of some grapevine rootstocks and cultivars, leading to great yield loss in grape production. The complete nucleotide sequence of an isolate of GINV type 1 was determined by small RNA sequencing and RT-PCR. The obtained GINV isolate LN_ANSJ_RS (KU971246) consisted of 7 239 nucleotides. The sequence analyses based on the complete genome sequences of GINV isolates showed that LN_ANSJ_RS only had 72.84%-76.61% nucleotide homology with the previously reported GINV isolates, and formed an independent evolution branch compared to other isolates in the phylogenetic tree. The phylogenetic analysis based on the CP and MP gene sequences of GINV isolates showed that LN_ANSJ_RS were divided into the variant type 1 group. This is the first report of the complete genome of GINV variant type 1.

Key words: *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV); small RNA sequencing; genome; sequence analysis

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)03-0423-05

近年来,随着高通量测序技术的运用,国内陆续发现和报道了一些新的葡萄病毒^[1-4],但由于尚缺乏相关的基础性研究及防治措施,给葡萄产业的健康发展带来一定影响。其中,葡萄浆果内坏死病毒(*Grapevine berry inner necrosis virus*, GINV)为2016年国内新报道的葡萄病毒,可引起一些葡萄砧木和品种产生褪绿斑驳和环斑症状,造成严重危害^[2, 5]。GINV最早在日本发现,能够引起一些敏感的葡萄生长减弱、萌芽延迟、茎内坏死、短节、

花叶、果粒小,果皮变色及果肉坏死等症状^[6]。1997年,日本学者确定GINV为发状病毒属(*Tri-chovirus*)的一个新成员,其基因组由3个开放阅读框组成,分别编码复制酶(RP)、移动蛋白(MP)和外壳蛋白(CP)^[6]。目前,GINV仅在日本和中国报道。依据GINV的CP和MP基因序列,可将GINV分离物划分为3个变种类型。其中,我国大部分GINV分离物属于类型1和2^[5]。GenBank数据库目前仅公布了3个GINV全长基因组,其

收稿日期: 2017-07-25; 修回日期: 2017-08-28; 网络出版时间: 2017-08-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170828.1804.001.html>

基金项目: 国家葡萄产业技术体系建设项目(CARS-30-bc-3)

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

中,日本分离物(D88448)属于类型3,中国分离物LN_BETA_RS和LN_Ths_RS(KU234316、KU234317)属于类型2^[2,5]。至今,GINV变种类型1尚未获得其全长基因组序列。

本研究结合小RNA测序和RT-PCR,对安尼斯基(Ayaneskeal)葡萄叶片的GINV全长基因组进行测定,获得了一个GINV变种类型1的全长分离物。该研究结果不仅能丰富GINV种群信息,而且对于全面了解GINV的遗传进化,深入研究其生物学特性意义重大。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄样品为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)栽植的安尼斯基葡萄,在春季和夏季均表现明显的褪绿斑驳及环斑症状(图1)。秋季,采集已木质化的葡萄枝条用液氮速冻后,放入-80℃超低温冰箱保存待用。



Fig. 1 The ringspot symptoms on the leaf of the 'Ayaneskeal' grapevine

1.2 小RNA测序及分析

将采集的枝条通过干冰运输至北京诺赛基因组研究中心有限公司,委托其对韧皮部组织中的小RNA进行深测序。原始数据过滤、小RNA组装及Blast比对按照已报道的方法进行^[2]。

1.3 RNA提取及反转录

采用柱式提取方法进行总RNA的提取,具体操作步骤见参考文献[8]。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 μL、6 bp 随

机引物(上海生工生物工程技术服务公司合成)1.0 μL,总RNA 2.0 μL,离心混匀,95℃水浴5 min,冰上放置2 min;加入5×M-MLV buffer 5.0 μL、10 mmol·L⁻¹dNTPs 1.5 μL、200 U·mL⁻¹ M-MLV 逆转录酶 0.8 μL、灭菌纯水 2.7 μL,37℃水浴10 min,42℃ 50 min,70℃ 5 min。合成的cDNA用于PCR扩增或者放-20℃冰箱保存。

1.4 GINV全长基因组扩增及克隆、测序

根据小RNA拼接获得的GINV序列设计引物(表1),分3段扩增GINV全基因组序列(图2)。GINV的3'和5'端非编码序列扩增按照Clontech试剂盒的说明进行。对PCR扩增获得的DNA片段进行回收纯化后,与零背景TOPO平末端载体室温连接5 min,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α感受态细胞,挑取单克隆菌落进行菌液培养,经PCR鉴定获得阳性的重组质粒,送测序公司进行测序。

1.5 序列分析

将所有GINV全长分离物以及2个*Grapevine Pinot gris virus*(GPGV)分离物的RP、MP和CP基因序列进行核苷酸和氨基酸同源性比对,并采用MEGA6.0的Maximum Likelihood方法构建基于全基因组水平的系统进化树。同时,将分离物LN_ANSJ_RS与已确定变种类型的分离物的CP和MP基因序列分别进行系统进化树分析,以明确其变种类型。

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48、880、842和29、319、407。其中,来源于GINV的小RNA数为15、942,获得的片段(contigs)序列为12条。此外,其他几种病毒和类病毒的基因序列也被发现,包括葡萄卷叶相关病毒3(*Grapevine leafroll-associated virus-3*, GLRaV-3)、葡萄双生病毒A(*Grapevine geminivirus A*, GGVA)、葡萄黄斑类病毒1(*Grapevine yellow speckle viroid 1*, GYSVd1)、葡萄黄斑类病毒2(*GYSVd2*)及啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*, HSVd)。

2.2 GINV 分离物 LN_ANSJ_RS 的全长基因组及序列比对

本研究获得了一个 GINV 分离物全长序列,命名为 LN_ANSJ_RS,其基因组全长为 7 239 nt(登录号:KU971246)。该分离物比中国分离物 LN_Ths_RS 和 LN_BETA_RS (KU234316、KU234317, 7 229 nt)多 10 nt,比日本分离物(D88448, 7 241 nt)少 2 nt。GINV 分离物 LN_ANSJ_RS 包含 3 个开放阅读框(ORFs),ORF1~3 分别编码复制酶(RP,100~5 706 nt)、移动蛋白(MP,5 612~6 661

nt),外壳蛋白(CP, 6 570-7 157 nt)(图 2)。

分离物 LN_ANSJ_RS 与其他 GINV 分离物的全基因组核苷酸序列之间的同源性仅为 72.84%~76.61%,与其他 GINV 分离物的 5'-UTR 和 3'-UTR 序列之间具有较高的同源性,分别为 87.88%~97.98%和 93.83%~96.30%(表 2)。相对于 MP 和 RP 基因,分离物 LN_ANSJ_RS 与其他 GINV 分离物的 CP 基因核苷酸和氨基酸序列之间具有较高的同源性,分别为 78.91%~83.16%和 86.67%~94.36%(表 2)。

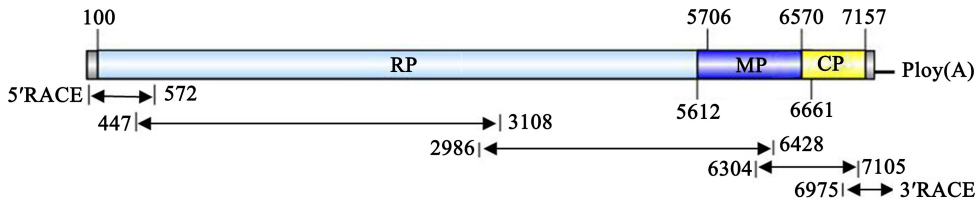


Fig. 2 The diagram of the genomic structure of the GINV isolate LN_ANSJ_RS

Numbers under the genome are the nucleotide positions of the PCR primers used in amplification

Table 1 The primers for the complete sequence amplification of GINV isolate LN_ANSJ_RS

Primer	Sequence(5'-3')	Position/nt
GINV5'-out	CTTGGACCAATGATGCAGTTC	597-576
GINV5'-in	TGCAAGAAGATATCCAAACCA	572-551
GINV 1F	TCAGACAATGTCCAATTGAAT	447-468
GINV 1R	ACAGTGGACGCCAGTTGTGCC	3108-3087
GINV 2F	TCATTGAGAATCTAAGGAACG	2986-3007
GINV 2R	TGTCTTCAAAGTTGAGAGGAC	6428-6407
GINV 3F	CCCACTGACAGCTCGAAGA	6304-6323
GINV 3R	TTCTCACTCTCGACACGAA	7105-7086
GINV3'OUT	ATGGTGTGCATTCCAATATCT	6939-6960
GINV 3'IN	AGATCTGTGATAAAGCGCCAG	6975-6996

Table 2 The percentage of nucleotide/amino acid sequence identity between the isolate LN_ANSJ_RS and other GINV and GPGV isolates

Virus species	Isolates	GenBank ID	Genome	5'-UTR	RP	MP	CP	3'-UTR
GINV		KU234316	76.56/-	97.98/-	74.87/82.09	81.43/86.53	83.16/94.36	93.83/-
		KU234317	76.61/-	97.98/-	74.92/81.98	81.43/86.53	83.33/94.36	93.83/-
		D88448	72.84/-	87.88/-	71.02/76.75	78.19/82.23	78.91/86.67	96.30/-
GPGV		KM491305	66.57/-	79.31/-	66.80/69.22	70.00/69.91	68.54/71.79	74.14/-
		KF134123	67.10/-	73.74/-	66.71/69.33	70.10/69.63	69.22/72.31	68.29/-

2.3 系统进化树分析

系统进化树分析结果显示 LN_ANSJ_RS 的 CP 和 MP 基因序列分别与变种类型 1 的分离物的 CP 和 MP 序列聚在一起。因此,分离物 LN_ANSJ_RS 应归属于 GINV 变种类型 1 组群(图 3-A 和图 3-B)。同时,基于 GINV 全基因组核苷酸序列构建的进化树分析结果显示, LN_ANSJ_RS 形成一个独立的进化分支(图 3-C)。

3 讨论

对于新的病毒或者病毒新的变种,由于缺少足够的基因序列信息,采用常规的分子检测方法进行鉴定时显得较为困难。目前,高通量测序技术在鉴定新病毒或病毒新变种方面发挥着重要作用^[10]。近年来,采用高通量测序技术已鉴定出许多新的葡

萄病毒或新的变种^[3,4,9,10]。其中,小 RNA 测序是高通量测序的一种,具有快速、有效地鉴定病毒的特点^[11]。本研究首先采用小 RNA 测序对发病的安尼斯基葡萄进行深测序,再根据基因序列设计引物进行扩增,成功地获得了 GINV 变种类型 1 基因组全长序列。

GINV 是国内新报道的病毒。前期研究表明 GINV 在我国发生普遍,能导致一些敏感的葡萄品种产生严重的病毒病症状^[5]。为防止该病毒进一步传播、流行及危害,开展相关研究十分必要,而获得 GINV 主要变种类型的全基因组序列,对该病毒的遗传进化及生物学特性研究有重要意义。前期研究表明危害我国葡萄的 GINV 分离物大多数属于变种类型 1^[5],GINV 变种类型 1 分离物全长基因组的获得将为今后该病毒的深入研究打下较好的基础。

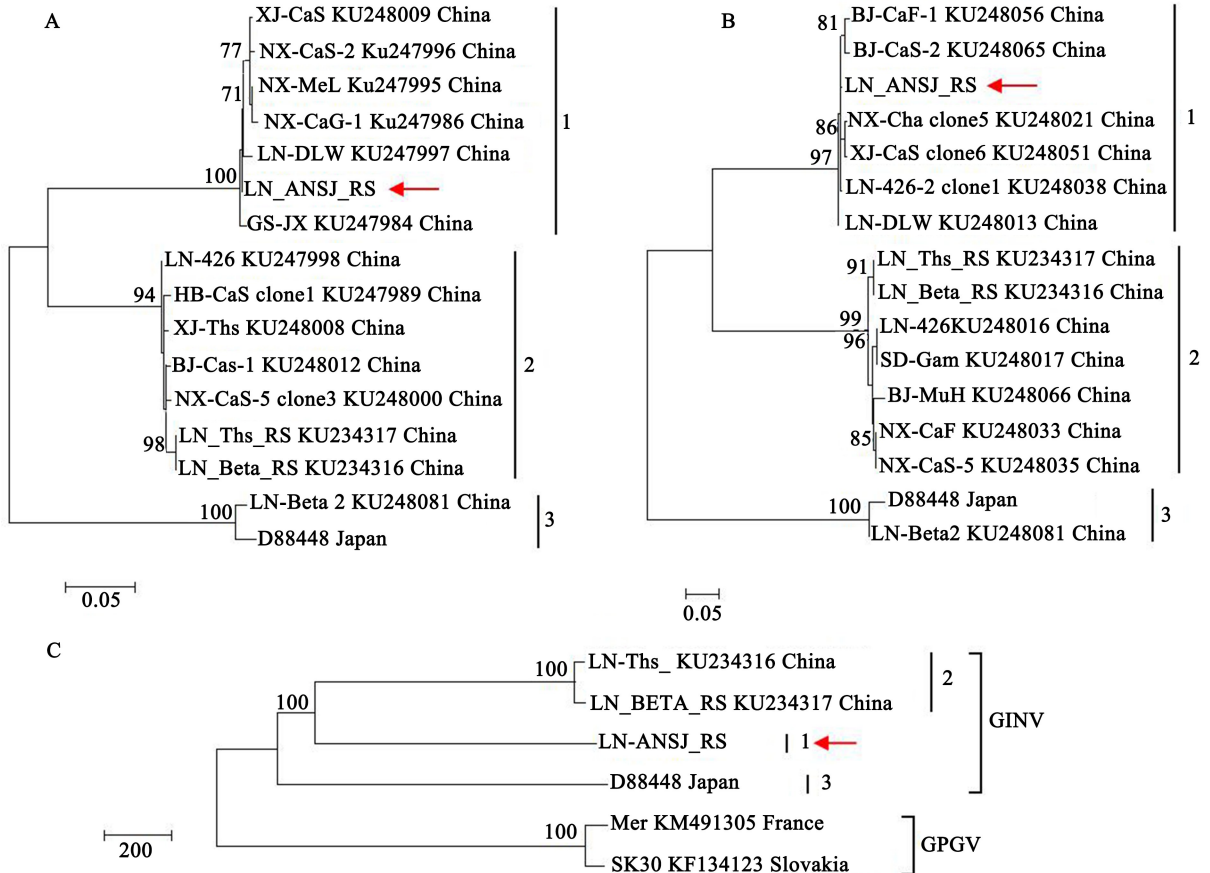


Fig. 3 Phylogenetic analyses of GINV isolate LN_ANSJ_RS and other GINV isolates

A: Phylogenetic analysis based on the CP gene sequences; B: Phylogenetic analysis based on the MP gene sequences;

C: Phylogenetic analysis based on the complete genome sequences. The GINV isolate LN_ANSJ_RS (KU971246) is indicated by arrow.

参考文献

- [1] Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, *et al.* First report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevines in China [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 540.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Fan X D, Zhang Z P, Ren F, *et al.* First report of Grapevine geminivirus A from grapevines in China [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(7):1333.
- [5] Fan X D, Zhang Z P, Ren F, *et al.* Occurrence and genetic diversity of Grapevine berry inner necrosis virus from grapevines in China [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(1): 144-149.
- [6] Yoshikawa N, Iida H, Goto S, *et al.* Grapevine berry inner necrosis, a new trichovirus; comparative studies with several known *Trichoviruses* [J]. *Archives of Virology*, 1997, 142(7): 1351-1363.
- [7] LI H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [8] 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.
- [9] Massart S, Candresse T, Gil J, *et al.* A framework for the evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:45.
- [10] Basso M F, Fajado T V M, Saldarelli P. Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management [J]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2017, 39(1): e-411.
- [11] Qian Y J, Xu Y, Zhou Q, *et al.* Application of next-generation sequencing technology for plant virus identification [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014, 44(4): 351-363.

责任编辑:于金枝