

葡萄卷叶伴随病毒 1 号和 3 号宁夏分离物部分基因序列分析

吕苗苗, 李文学, 孙牧笛, 胡丽杰, 顾沛雯*

(宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘要 为明确葡萄卷叶伴随病毒(GLRaVs)在宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄上的侵染状况,采用 RT-PCR 技术对 40 份酿酒葡萄样品中的 GLRaV-1~GLRaV-5 进行了外壳蛋白(CP)、复制酶(RdRp)和热激蛋白(HSP70)基因序列的克隆和分析。检测结果表明,在所检测的 5 种病毒中,除 GLRaV-2 和 GLRaV-4 未检测到外,GLRaV-1 和 GLRaV-3 的检出率最高,分别为 20.0%和 32.5%,GLRaV-5 的检出率仅为 5.0%;有 6 个样品存在 GLRaV-1 和 GLRaV-3 两种病毒复合侵染。序列分析表明,GLRaV-1 宁夏分离物的部分 CP 基因序列长度为 232 nt,其两种分离物间的核苷酸序列同源率为 90%,与已报道的国内外其他分离物 CP 基因序列相比,其同源率为 90%~99%;GLRaV-3 宁夏分离物的 CP 基因序列长度为 942 nt,其两种分离物间的核苷酸序列同源率为 40%,与已报道的国内外其他分离物 CP 基因序列相比,其同源率为 40%~99%;GLRaV-3 宁夏分离物的 RdRp 基因序列长度为 683 nt,其各分离物间的核苷酸序列同源率为 90%以上,与已报道的国内外其他分离物 RdRp 基因序列相比,其同源率为 90%~99%;GLRaV-3 宁夏分离物的 HSP70 基因序列长度为 546 nt,其两种分离物间的核苷酸序列同源率为 96%,与已报道的国内外其他分离物 HSP70 基因序列相比,其同源率为 96%~99%。

关键词 葡萄卷叶伴随病毒(GLRaVs); RT-PCR 检测; 克隆; 序列分析

中图分类号: S 436.631 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017187

Sequence analysis of the genes of *Grapevine leafroll-associated viruses 1 and 3* from Ningxia isolates

LÜ Miaomiao, LI Wenxue, SUN Mudi, HU Lijie, GU Peiwen

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract To understand the infection status of *Grapevine leaf roll-associated virus* in wine grapes grown in Helan Mountain East Region of Ningxia, RT-PCR was used to clone the coat protein (CP), replication enzyme (RdRp) and heat shock protein (HSP70) gene sequences of *Grapevine leaf roll-associated virus* 1-5 in 40 wine grape samples and gene sequence analysis was conducted. The results showed that the detection rate of GLRaV-1 and GLRaV-3 in all samples was 20.0% and 32.5%, respectively, but the detection rate of GLRaV-5 was only 5.0%; in addition, GLRaV-2 and GLRaV-4 were not detected in the samples, GLRaV-1 and GLRaV-3 showed compound infection in six samples. The sequence analysis showed that each partial sequence of GLRaV-1-CP gene of the two isolates was 232 nt long and their nucleotide sequence homology was 90%, and their nucleotide sequence homology with those of previously reported isolates was 90%—99%. Each of the complete sequence of GLRaV-3-CP gene of the two isolates was 942 nt long, sharing a nucleotide sequence homology of 40%. Their nucleotide sequence homology with those of previously reported isolates was 40%—99%. Each of the complete sequence of GLRaV-3-RdRp gene of the three isolates was 683 nt long, sharing a nucleotide sequence homology of 90%, and their nucleotide sequence homology with those of previously reported isolates was 90%—99%. Each of the complete sequence of GLRaV-3-HSP70 gene of the two isolates was 546 nt long, sharing a nucleotide sequence homology of 96%, and their nucleotide sequence homology with those of previously reported isolates was 96%—99%.

Key words *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaVs); RT-PCR detection; cloning; sequence analysis

收稿日期: 2017-05-20

修订日期: 2017-08-02

基金项目: 宁夏教育厅项目(NGY14011);宁夏重点研发计划重大项目(2016BZ06)

* 通信作者 E-mail: gupeiwen2013@126.com

葡萄卷叶病 (grapevine leafroll disease, 简称 GLRD) 是世界范围内分布最广, 造成损失最大的一种葡萄病毒病, 已成为世界葡萄栽培地区生产中的严重问题。现已研究表明, 引起该病的病原是葡萄卷叶伴随病毒 *Grapevine leafroll-associated viruses*, 简称 GLRaVs, 该类病毒目前已查明共有 11 种, 包括 GLRaV-1~GLRaV-9、GLRaV-Pr 和 GLRaV-De, 这些病毒在血清学和分子生物学上互不相关, 单独或复合侵染葡萄均可导致卷叶病的发生^[1]。

目前, 国内发现至少有 10 种 GLRaVs 与该病相关, 其中 GLRaV-1~GLRaV-5 是造成葡萄卷叶病的主要病原^[2], 且复合侵染现象比较普遍^[3]。这 5 种病毒均属长线形病毒科 *Closteroviridae*, 其基因组为正单链 RNA, GLRaVs 全长约 12~19 kb, 由 8~13 个开放阅读框 (ORF) 组成, 其中 GLRaV-1 基因组和 GLRaV-3 基因组分别包括 10 个主要的 ORF 和 13 个 ORF, 主要编码类木瓜蛋白酶 (P-Pro)、甲基转移酶 (MTR)、螺旋酶 (HEL)、复制酶 (RdRp)、热激蛋白 (HSP70)、外壳蛋白 (CP) 和重复的外壳蛋白 (CPd) 及几种功能未知的蛋白。由于在葡萄树中病毒含量通常较低, 因此灵敏度高、特异性强的逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, 简写 RT-PCR) 在这几种病毒检测中应用广泛。

宁夏贺兰山东麓是国内公认的种植酿酒葡萄的最佳生态区, 近年来, 由于葡萄种植新区的建立和栽培面积的扩大, 葡萄品种繁殖材料在各地的引进和输出也日益频繁, 造成葡萄卷叶病危害猖獗。2015 年, 在贺兰山东麓的新牛和新惠彬酒庄葡萄园中, ‘蛇龙珠’品种葡萄卷叶病田间自然发病率分别达 85.1% 和 52.7%, 个别果园发病率甚至达到 100%^[4]。因此, 本研究借鉴了国内外有关 GLRaVs 在 CP、RdRp、HSP70 基因克隆和序列分析方面的研究结果, 进行宁夏 GLRaVs 分离物的分子检测和序列比对分析, 目的是评判宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄的健康状况, 为减少 GLRaVs 在该区域的传播和蔓延提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

参试酿酒葡萄品种材料来自贺兰山东麓 8 个主要的葡萄产地, 分别为宁夏永宁县玉泉营农产新惠彬酒庄、农垦东大滩酿酒葡萄基地、农垦南大滩酿酒葡萄基地和闽宁镇立兰酒庄; 银川市金凤区广夏三

基地和森森兰月谷酒庄; 银川市西夏区新牛酒庄和志辉-源石酒庄。

供试品种为 ‘赤霞珠’ (‘Cabernet Sauvignon’)、‘蛇龙珠’ (‘Cabernet Gernischt’)、‘黑比诺’ (‘Pinot Noir’)、‘霞多丽’ (‘Chardonnay’)、‘品丽珠’ (‘Cabernet Franc’)、‘美乐’ (‘Merlot’)、‘西拉’ (‘Shiraz’) 和 ‘威代尔’ (‘Vidal’)。

1.2 采样方法

采集样品在酿酒葡萄栽培园和葡萄品种园进行。随机选择单株, 每个单株剪取 6~10 片叶及 5~10 个枝条, 嫩叶片采集于树体上部枝条第 3~5 节上, 老叶片采集于下部枝条第 5 节以后; 嫩枝条采集于未木质化的上部新梢, 老枝条采集于下部已木质化的枝条; 嫩叶柄为嫩叶片的叶柄, 老叶柄为老叶的叶柄。将样品立即用锡箔纸包好, 注明采集日期、地点、品种、品种来源、种植面积等, 置于液氮罐中, 室内于 -80℃ 冰箱中保存, 备用。

1.3 GLRaVs 分子检测

1.3.1 引物序列

根据文献^[5-10], 设计 GLRaV-1~GLRaV-5 的特异性引物, 引物序列如表 1。

1.3.2 RNA 提取

称取葡萄叶柄、枝条韧皮部组织 100 mg, 加入液氮迅速研磨至粉末状, 并将粉末转移到 1.5 mL 的离心管中, 按照 OMEGA 提取 RNA 试剂盒 (美国 OMEGA 公司) 使用说明书进行总 RNA 的提取。

1.3.3 RT-PCR 检测

提取出的总 RNA 采用反转录试剂盒 (北京全式金生物有限公司) 反转录成 cDNA, 每个反应体系为 20 μ L, 先加入总 RNA 4 μ L、OligDT₁₈ Primer 1 μ L、RNase-free Water 3 μ L 置于 65℃ 温浴 5 min, 取出冰浴 2 min; 再加入 2×TS Reaction Mix 10 μ L、TransScript™ RT 1 μ L、gDNA Remover 1 μ L, 轻轻混匀, 于 42℃ 孵育 30 min, 之后经 85℃ 加热 5 s, 失活 TransScript™ RT 和 gDNA Remover, 即可得到所需的 cDNA。

采用设计的特异性引物 GLRaV-1~GLRaV-5 对样品中病毒进行检测。PCR 扩增反应体系 25 μ L: 总 DNA 2 μ L, 正向、反向引物各 2 μ L, Max Taq 酶 25 μ L, RNase-free Water 18 μ L; PCR 扩增条件: 94℃ 3 min, 94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。PCR 产物由武汉昆泰公司进行测序。

表 1 GLRaV-1~GLRaV-5 的特异性引物序列
Table 1 The specific primers for GLRaV-1-GLRaV-5

病毒 Virus	基因 Gene	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	T _m /°C	扩增片段大小/bp Amplicon size	参考文献 Reference
GLRaV-1	CP	F1	TCTTTACCAACCCGAGATGAA	52	232	[5]
		R1	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG			
GLRaV-2	CP	F2	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT	52	93	[6]
		R2	GATGACAACCTTCTGTCCGCTATAGC			
GLRaV-3	CP	F	ATGGCATTTGAACTGAAAT	52	942	[7]
		R	CTACTTCTTTTGCAATAGT			
	RdRp	W4	CCATTTGTCCAGCAACAC	55	683	[8]
		W5	CCGACTAAATATAAGGCTATC			
	HSP70	F3	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	55	546	[9]
R3	GTTGTCCCGGTACCAGATAT					
GLRaV-4	CP	F4	ACATTCTCCACCTTGTGCTTTT	52	321	[10]
		R4	CATACAAGCGAGTGCAATTAC			
GLRaV-5	CP	F5	CCCGTGATACAAGGTAGGACA	55	690	[9]
		R5	CAGACTTCACCTCCTGTTAC			

1.4 GLRaV-1 和 GLRaV-3 宁夏分离物部分基因组的系统进化分析

从 GenBank 中获得 4 个不同地理来源的 GLRaV-1 分离株 CP 基因序列,分别为中国辽宁分离物 GS-ITRI-1(KP067351)和 BJ-MuH(KP067359)、美国分离物 CA22(JF811849)和加拿大分离物 WC4-29(EF103902);5 个不同地理来源的 GLRaV-3 分离株 CP 基因序列,分别为中国北京分离物 YN-1(KC477181)、四川分离物 SL10(DQ911148)和湖北分离物 Dawanhong NO. 2(DQ119574)、美国分离物 WA-MR(GU983863)和智利分离物 TRAJ-BR(KX756669)。4 个不同地理来源的 GLRaV-3 分离株 RdRp 基因序列,分别为中国北京分离物 LN(JQ423939)、湖北分离物 GLRaV-3-AY-HB(AY495340)、意大利分离物 CN415-1(GU812895)和南非分离物 621(GQ352631);4 个不同地理来源的 GLRaV-3 分离株 HSP70 基因序列,分别为中国辽宁分离物 GLRaV-3-GQ-LN(GQ246623)和 L1(GQ478313)、美国分离物 VAFL049(KF417602)和智利分离物 4262-LR3(HM636879)。小樱桃病毒 *Little cherry virus* (简称 LChV)作为同属的外组病毒,分别为法国分离物 PR2910(KT347315)、波兰分离物 C14(EU153101)、美国分离物 Jeju63(KP410831)和美国分离物 LChV-AY-MG(AY944067)。

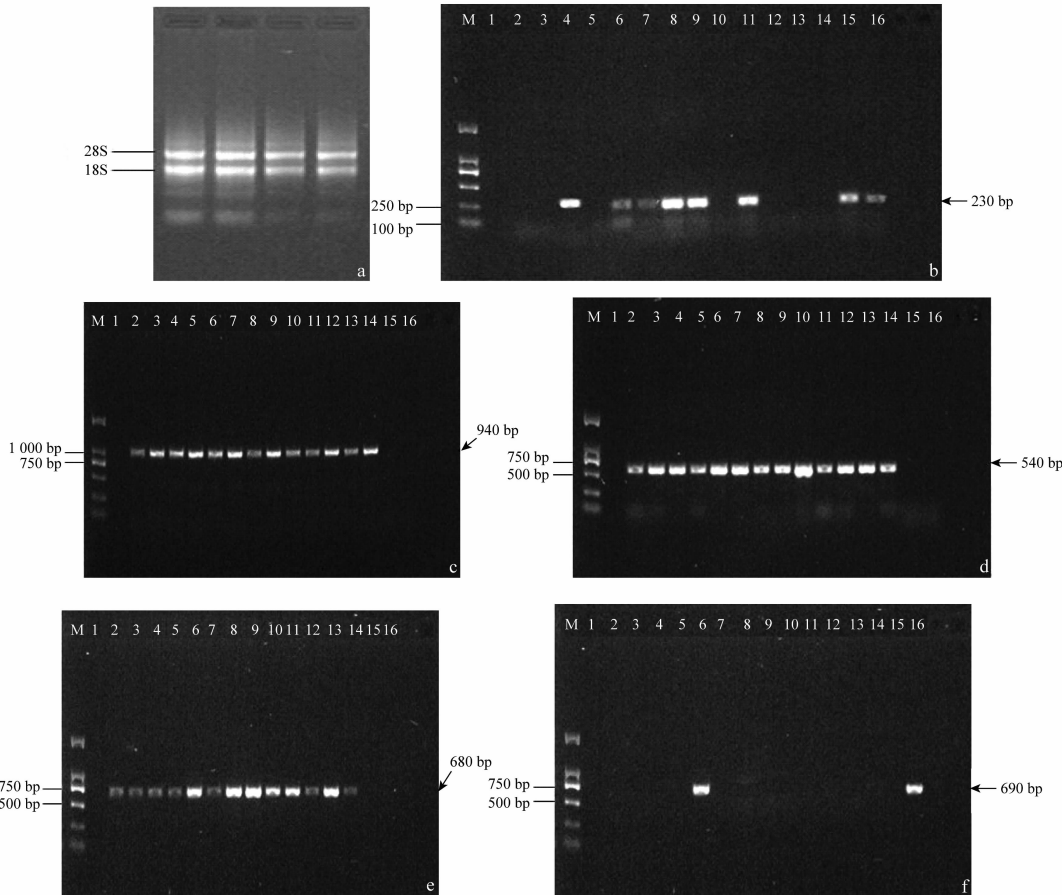
利用 DNAMAN5. 2. 2 软件进行多重比对 (Clustal W 方法),分析不同分离株间的核酸序列相似性。邻接法(设定 1 000 重复值的 bootstrap 评估

遗传距离分支的可信度)构建不同地理起源分离株的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量及 RT-PCR 检测结果

由图 1a 可知,酿酒葡萄总 RNA 有两条清晰明亮带,分别为 28S rRNA 和 18S rRNA。紫外分光光度计测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值约为 2. 15,表明所提取的总 RNA 完整性和纯度较好。以此为模板,采用 RT-PCR 分别检测 GLRaV-1~GLRaV-5 的 CP 基因序列与 GLRaV-3 的 HSP70 和 RdRp 基因序列。结果表明,GLRaV-1 部分 CP 基因和 GLRaV-3 的 CP 基因扩增产物条带片段大小分别为 230 bp 和 940 bp 左右,与预期的 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的 CP 基因序列大小相符(图 1b 和 c),初步定名为 GLRaV-1-CP-NX 和 GLRaV-3-CP-NX(宁夏分离物)。采用 GLRaV-3 的 HSP70 和 RdRp 基因特异性引物对宁夏分离物进行 RT-PCR 检测,获得的扩增产物片段大小分别为 540 bp 和 680 bp 左右,与预期的 GLRaV-3 的 HSP70 和 RdRp 基因序列大小相符(图 1d 和 e),且检测结果与 GLRaV-3 的 CP 基因阳性率一致。初步定名为 GLRaV-3-HSP70-NX 和 GLRaV-3-RdRp-NX(宁夏分离物)。GLRaV-5 的 CP 基因扩增产物条带片段大小为 690 bp 左右,与预期的 GLRaV-5 的 CP 基因序列大小相符(图 1f),初步定名为 GLRaV-5-CP-NX(宁夏分离物)。



a: 酿酒葡萄总RNA提取电泳图; b: GLRaV-1-CP-NX; c: GLRaV-3-CP-NX; d: GLRaV-3-HSP70-NX; e: GLRaV-3-RdRp-NX; f: GLRaV-5-CP-NX; 1: 空白对照(清水); 2: ‘赤霞珠’(立兰酒庄); 3: ‘赤霞珠’(志辉-源石酒庄); 4: ‘赤霞珠’(农垦东大滩); 5: ‘蛇龙珠’(新牛酒庄); 6: ‘蛇龙珠’(新惠彬酒庄); 7: ‘蛇龙珠’(农垦东大滩); 8: ‘黑比诺’(新惠彬酒庄); 9: ‘霞多丽’(立兰酒庄); 10: ‘品丽珠’(广夏三基地); 11: ‘品丽珠’(新惠彬酒庄); 12: ‘西拉’(广夏三基地); 13: ‘美乐’(农垦南大滩); 14: ‘美乐’(广夏三基地); 15: ‘赤霞珠’(新惠彬酒庄); 16: ‘西拉’(新惠彬酒庄)
a: Total RNA extraction of wine grape; b: GLRaV-1-CP-NX; c: GLRaV-3-CP-NX; d: GLRaV-3-HSP70-NX; e: GLRaV-3-RdRp-NX; f: GLRaV-5-CP-NX; 1: Negative control (water); 2: ‘Cabernet Sauvignon’ (Lilan winery); 3: ‘Cabernet Sauvignon’ (Zhihui-Yuanshi winery); 4: ‘Cabernet Sauvignon’ (The east of agricultural reclamation); 5: ‘Cabernet Gernischt’ (Xinniu winery); 6: ‘Cabernet Gernischt’ (Xinhuibin winery); 7: ‘Cabernet Gernischt’ (The east of agricultural reclamation); 8: ‘Pinot Noir’ (Xinhuibin winery); 9: ‘Chardonnay’ (Lilan winery); 10: ‘Cabernet Franc’ (The third grape base of Guangxia); 11: ‘Cabernet Franc’ (Xinhuibin winery); 12: ‘Shiraz’ (The third grape base of Guangxia); 13: ‘Merlot’ (The south of agricultural reclamation); 14: ‘Merlot’ (The third grape base of Guangxia); 15: ‘Cabernet Sauvignon’ (Xinhuibin Winery); 16: ‘Shiraz’ (Xinhuibin Winery)

图 1 酿酒葡萄总 RNA 和 GLRaVs 宁夏分离物的基因克隆

Fig. 1 Total RNAs of wine grape and gene cloning of GLRaVs in Ningxia isolates

由表 2 可知,贺兰山东麓的 8 个种植区 8 个酿酒葡萄品种的 40 份样品中,除 GLRaV-2 和 GLRaV-4 未检测到,GLRaV-1、GLRaV-3 和 GLRaV-5 均有不同程度的检出,其阳性样品的检出率分别为 20.0%、32.5%和 5.0%,在 8 个酿酒葡萄品种中,

除‘威代尔’未检测出 GLRaV 外,其他 7 个品种均检测出不同类型的 GLRaV,其中‘蛇龙珠’和‘品丽珠’的 GLRaV-3 的检出率高达 50.0%。此外,有 6 个样品存在 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的复合侵染,复合侵染率为 15.0%。

表 2 酿酒葡萄样品的 RT-PCR 检测

Table 2 RT-PCR detection of wine grape samples

品种 Variety	样本数/个 Sample number	病毒检出率/% Virus detection rate				
		GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-5
赤霞珠 Cabernet Sauvignon	10	20.0	0.0	30.0	0.0	0.0
蛇龙珠 Cabernet Gernischt	6	33.3	0.0	50.0	0.0	16.7
品丽珠 Cabernet Franc	4	25.0	0.0	50.0	0.0	0.0
黑比诺 Pinot Noir	4	25.0	0.0	25.0	0.0	0.0
霞多丽 Chardonnay	4	25.0	0.0	25.0	0.0	0.0
美乐 Merlot	6	0.0	0.0	33.3	0.0	16.7
西拉 Shiraz	4	25.0	0.0	25.0	0.0	0.0
威代尔 Vidal	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
总计 Total	40	20.0	0.0	32.5	0.0	5.0

2.2 GLRaV-1-CP-NX 核苷酸序列的分析比较

将 8 个 GLRaV-1 宁夏分离物的 CP 基因的核苷酸序列与 NCBI 中注册的序列进行同源性比对,发现共有 2 种不同的宁夏分离物 GLRaV-1-CP-NX,CP 基因序列长度均为 232 nt,分别定名为 GLRaV-1-CP-NX1 和 GLRaV-1-CP-NX2,其比例为 3:1。根据已报道的 4 个不同地理来源的 GLRaV-1-CP 序列作为参照,建立系统进化树。

由图 2 可知,两种宁夏分离物 GLRaV-1-CP-NX1 和 GLRaV-1-CP-NX2 的核苷酸序列相似性为 90%,分别聚在 2 个分支中,其中 GLRaV-1-CP-NX1 与中国辽宁分离物 GS-ITRI-1(KP067351)序列相似性最高,为 99%,其次与美国分离物 CA22(JF811849)的相似性为 97%;与加拿大分离物 WC4-29(EF103902)的相似性 95%。宁夏分离物 GLRaV-1-CP-NX2 与中国辽宁另一分离物 BJ-MuH(KP067359)的相似性较高,为 99%,而与美国分离物 CA22(JF811849)和加拿大分离物 WC4-29(EF103902)和中国辽宁分离物 GS-ITRI-1(KP067351)的相似性较低,分别为 92%、91%和 90%。2 个 GLRaV-1 宁夏分离物 CP 基因序列与小樱桃病毒法国分离物 PR2910(KT347315)的相似性均存在较大差异,一致性均为 40%。说明 GLRaV-1 宁夏分离物存在着分子变异,在宁夏至少存在 2 株变异株系。

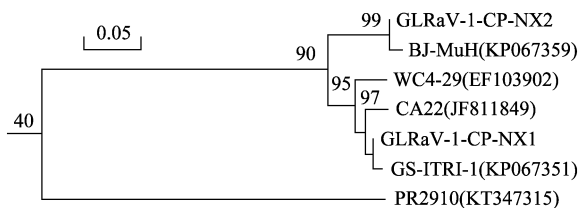


图 2 GLRaV-1 分离株 CP 基因核苷酸序列系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of GLRaV-1-CP based on nucleotide sequences from different isolates

2.3 GLRaV-3-CP(RdRp 和 HSP70)-NX 核苷酸序列的分析比较

将 13 个 GLRaV-3 宁夏分离物的 CP、RdRp 和 HSP70 基因的核苷酸序列与 NCBI 中的同源序列进行比对,发现共存在 2 种不同的 CP 基因序列,分别定名为 GLRaV-3-CP-NX1 和 GLRaV-3-CP-NX2, GLRaV-3 CP 基因序列长度均为 942 nt;3 种不同的 RdRp 基因序列,分别定名为 GLRaV-3-RdRp-NX1、GLRaV-3-RdRp-NX2 和 GLRaV-3-RdRp-

NX3, GLRaV-3 RdRp 基因序列长度均为 683 nt;2 种不同的 HSP70 基因序列,分别定名为 GLRaV-3-HSP70-NX1 和 GLRaV-3-HSP70-NX2, GLRaV-3 HSP70 基因序列长度均为 546 nt。根据已报道的不同地理来源的 GLRaV-3 的 CP、RdRp 和 HSP70 基因序列作为参照,建立系统进化树。

由图 3a 可知, GLRaV-3-CP-NX1 和 GLRaV-3-CP-NX2 的核苷酸序列相似性为 40%,分别聚在 2 个分支中,其中 GLRaV-3-CP-NX1 与国内的北京分离物 YN-1(KC477181)、四川分离物 SL10(DQ911148)和湖北分离物 Dawanhong NO. 2(DQ119574)及国外的美国分离物 WA-MR(GU983863)、智利分离物 TRAJ-BR(KX756669)的相似性达到 99%。而 GLRaV-3-CP-NX2 与国内外的分离物的一致性均较低,仅为 40%。GLRaV-3-CP-NX1 和 GLRaV-3-CP-NX2 均与小樱桃病毒波兰分离物 C14(EU153101)存在较大差异,相似性分别为 46%和 40%。

由图 3b 可知, GLRaV-3-RdRp-NX1、GLRaV-3-RdRp-NX2 和 GLRaV-3-RdRp-NX3 的核苷酸序列相似性为 90%以上,分别聚在 3 个分支中,其中 GLRaV-3-RdRp-NX1 与 GLRaV-3-RdRp-NX2 的相似性较高,为 96%,与 GLRaV-3-RdRp-NX3 的相似性较低,为 93%。GLRaV-3-RdRp-NX1 与国内湖北分离物 GLRaV-3-AY-HB(AY495340)和南非分离物 621(GQ352631)的相似性较高,为 98%,与意大利分离物 CN415-1(GU812895)和北京分离物 LN(JQ423939)的相似性分别为 93%和 90%。GLRaV-3-RdRp-NX2 与北京分离物 LN(JQ423939)的相似性为 90%,与其他分离物的相似性均在 96%左右。GLRaV-3-RdRp-NX3 与意大利分离物 CN415-1(GU812895)的相似性较高,为 98%,与其余国内外分离物的相似性均在 94%左右。而 3 个 GLRaV-3 宁夏分离物 RdRp 基因序列与小樱桃病毒美国分离物 Anning26(HQ412772)均存在较大差异,相似性均为 40%。

由图 3c 可知, GLRaV-3-HSP70-NX1 和 GLRaV-3-HSP70-NX2 的核苷酸序列相似性为 96%,分别聚在 2 个分支中,其中 GLRaV-3-HSP70-NX1 与国内的辽宁分离物 GLRaV-3-GQ-LN(GQ246623)、L1(GQ478313)和国外的美国分离物 VAFLO49(KF417602)、智利分离物 4262-LR3(HM636879)的相似性均达到 98%,而 GLRaV-3-HSP70-NX2 与 4 种国内外的分

离物的相似性为 96% 左右。2 个 GLRaV-3 宁夏分离物 HSP70 基因序列与小樱桃病毒美国分离物 LChV-AY-MG(AY944067) 均存在较大差异, 相似性均为 44%。

综上所述, GLRaV-3 宁夏分离物的 CP、RdRp 存在较大的分子变异, 推测 GLRaV-3 宁夏分离物可能存在 2~3 个变异类型。

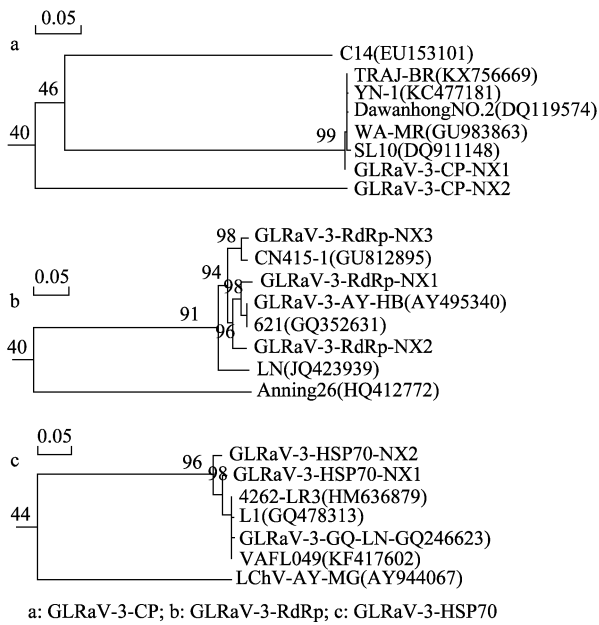


图 3 GLRaV-3 分离株 CP、RdRp 和 HSP70 基因核苷酸序列系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of GLRaV-3-CP, RdRp and HSP70 based on nucleotide sequences from different isolates

3 讨论

本研究主要对宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄种植区的 5 种 GLRaVs (GLRaV-1~GLRaV-5) 进行 RT-PCR 检测。除了 GLRaV-2 和 GLRaV-4 未检测到外, 其余 3 种 GLRaVs 均被检测到, 且 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的检测率较高, 分别为 20.0% 和 32.5%, 说明造成贺兰山东麓地区酿酒葡萄出现卷叶病症状的主要病原为 GLRaV-1 和 GLRaV-3。在检测的 40 份样品中, 有 6 份样品存在 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的复合侵染, 主要表现在种植 18~20 年的‘蛇龙珠’、‘黑比诺’、‘品丽珠’、‘赤霞珠’和‘霞多丽’品种上。由此可见, 随着种植年限的增加, GLRaVs 的复合侵染现象越发的明显, 同时也会引起 GLRaVs 的分子变异。GLRaVs 主要通过苗木调运和接穗的嫁接进行传播^[23], 生产上需要加强引进苗木的葡萄卷

叶病的检测力度, 切断葡萄卷叶病的嫁接传播途径, 从根本上杜绝葡萄卷叶病的危害。

通过对宁夏分离物 GLRaV-1-CP-NX 的 CP 基因的同源性比对, 发现两种不同的宁夏分离物 (GLRaV-1-CP-NX1 和 GLRaV-1-CP-NX2), 分别与辽宁分离物 GS-ITRI-1 和 BJ-MuH 的同源性较高, 确定为相同株系。国内外对 GLRaV-1 的 CP 基因分子变异有一定的研究。2013 年 Esteves 等^[24] 对葡萄牙的 20 个 GLRaV-1 分离物的 CP 基因进行序列分析, 证明 GLRaV-1 的 CP 基因内部存在不同变异株系的基因重组。2015 年 Fan 等^[25] 对中国 43 个 GLRaV-1 分离物的 CP 和 HSP70 基因进行序列分析, 结果显示大部分突变种与从‘Beta’植株上获得的分离物同属一组, 推测该部分变异种是由携带 GLRaV-1 变种的‘Beta’砧木嫁接传播导致的。宁夏酿酒葡萄发展迅速, 据报道在宁夏酿酒葡萄发展的初期, 曾经大量从我国东北地区引进‘Beta’等山葡萄品种作为砧木与欧亚种如‘赤霞珠’、‘品丽珠’和‘蛇龙珠’等进行嫁接, 可能经过长期的突变积累, 导致 GLRaV-1 不同变异株的复合侵染, 通过基因重组在现有栽培上出现了不同的变异株。

本文将 GLRaV-3 宁夏分离物的 CP、RdRp 和 HSP70 基因与 NCBI 中登记的序列进行同源性比对, 发现 GLRaV-3 的 CP 和 RdRp 基因序列存在较大的分子变异, 可以认为宁夏存在由于 CP 基因和 RdRp 基因突变而形成的 GLRaV-3 新的变异株系, 其中, GLRaV-3-CP-NX2 是由 GLRaV-1 和 GLRaV-3 复合侵染的酿酒葡萄‘蛇龙珠’中获得, 该分离物表现出较大的差异性, 由此可以推测是一种新的变异种。由于植物病毒本身的 RNA 聚合酶缺乏严密的校对修正功能, 使得其在宿主体内形成由一个主序列和与该序列相关的大量突变体集合的病毒种群, 称为准种病毒 (quasispecies)。2005 年 Turturo 等^[26] 研究发现 GLRaV-3 的不同变异种的复合侵染严重, 表明结构多样性的葡萄卷叶病毒种群是准种病毒。2013 年 Farooq 等^[27] 和 Liu 等^[28] 对 GLRaV-3 中国分离物进行多样性分析, 结果显示 CP 基因是 GLRaV-3 基因重组较活跃的区域, 不同变异种的基因重组形成了新的变异种。葡萄较长的生长周期、无病毒苗木检测技术的缺乏、病毒的基因突变以及不同变异株系的复合侵染为基因重组与进化提供了必要的条件。由于我国葡萄病毒病的研究起步

较晚,葡萄病毒病原方面的研究较少,而葡萄病毒病对葡萄产业的影响较大,因此,我们有必要在加强对这些病毒病原研究的同时,加强对葡萄病毒病检测技术的优化和无毒苗木的培育工作,为宁夏酿酒葡萄病毒病的监控提供技术支持。

参考文献

- [1] 王建辉,刘建军,陈克玲,等. 葡萄卷叶伴随 3 型病毒和葡萄 A 病毒的多重检测及其系统进化分析[J]. 园艺学报, 2011, 38 (12): 2401 - 2410.
- [2] 任芳,董雅凤,张尊平,等. 葡萄病毒研究最新进展[J]. 园艺学报, 2014, 41(9): 1777 - 1792.
- [3] 裴光前,董雅凤,张尊平,等. 我国葡萄主栽区卷叶病相关病毒种类的检测分析[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 463 - 468.
- [4] 徐美隆,陈春伶,谢军,等. 宁夏贺兰山东麓地区葡萄卷叶病发病与危害调查[J]. 北方园艺, 2015(22): 118 - 121.
- [5] OSMAN F, ROWHANI A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan) [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 133(2): 130 - 136.
- [6] MARTIN R R, EASTWELL K C, WAGNER A, et al. Survey for viruses of grapevine in Oregon and Washington [J]. Plant Disease, 2005, 89(7): 763 - 766.
- [7] LING K S, ZHU H Y, GONSALVES D. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine leafroll-associated virus 3*, type member of the genus *Ampelovirus* [J]. Journal of General Virology, 2004, 85(7): 2099 - 2102.
- [8] LING K S, ZHU H Y, DRONG R F, et al. Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the *Grapevine leafroll-associated virus-3* genome reveals a typical monopartite closterovirus [J]. Journal of General Virology, 1998, 79(5): 1299 - 1307.
- [9] 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.
- [10] GOOD X, MONIS J. Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of *Grapevine leafroll-associated virus-5* [J]. Phytopathology, 2001, 91(3): 274 - 281.
- [11] 王萌,费菲,周涛,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.
- [12] 王建辉,刘建军,陈克玲,等. 三种葡萄病毒的 RT-PCR 检测和系统进化分析[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 197 - 201.
- [13] 郑亚洲,王国平,周菊芳,等. 猕猴桃病毒 A 和 B 的 RT-PCR 检测及分子变异初步研究[J]. 园艺学报, 2015, 42(4): 665 - 671.
- [14] 梁巧玲,乾义柯,张娜,等. 新疆三种葡萄病毒 RT-PCR 检测及序列分析[J]. 植物保护学报, 2015, 42(3): 376 - 381.
- [15] 范旭东,董雅凤,张尊平,等. 葡萄病毒分子检测技术研究进展[J]. 园艺学报, 2014, 41(5): 1009 - 1019.
- [16] 牛建新,陈萍,李西平,等. 葡萄卷叶病毒 RT-PCR 检测技术研究[J]. 西北农业学报, 2004(1): 28 - 32.
- [17] 牛建新,陈萍,马兵钢,等. 葡萄病毒病多重 RT-PCR 检测技术优化体系优化分析[J]. 果树学报, 2004, 21(2): 120 - 123.
- [18] 牛建新,李东栋. 葡萄病毒病的双链 RNA(dsRNA)检测技术研究[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 149 - 152.
- [19] 王建辉,刘建军,陈克玲,等. 葡萄卷叶伴随 3 型病毒和葡萄 A 病毒的多重检测及其系统进化分析[J]. 园艺学报, 2011, 38 (12): 2401 - 2410.
- [20] 刘命华,王克双,齐洪华,等. 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[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(2): 90 - 93.
- [21] 王志江,杨海燕,向本春,等. 小西葫芦黄花叶病毒石河子分离物的分子变异[J]. 石河子大学学报, 2015, 12(6): 677 - 682.
- [22] 唐萌,金鑫,周常勇,等. 柑橘品种对不同基因型柑橘衰退病毒的抑制及变异的影响[J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 55 - 60.
- [23] 胡国君,董雅凤,张尊平,等. 葡萄病毒脱除技术研究进展[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 304 - 310.
- [24] ESTEVES F, SANTOS M T, EIRAS-DIAS J E, et al. Molecular data mining to improve antibody-based detection of *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1) [J]. Journal of Virological Methods, 2013, 194(1/2): 258 - 270.
- [25] FAN Xudong, HONG Ni, DONG Yafeng, et al. Genetic diversity and recombination analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 1* from China [J]. Archives of Virology, 2015, 160(7): 1669 - 1678.
- [26] TURTURO C, SALDARELLI P, DONG Yafeng, et al. Genetic variability and population structure of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates [J]. Journal of General Virology, 2005, 86(1): 217 - 224.
- [27] FAROOQ A B U, MA Yanxia, WANG Zeqiong, et al. Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in *Grapevine leafroll-associated virus 3* in China [J]. Virus Research, 2013, 171(1): 15 - 21.
- [28] LIU M H, LI M J, QI H H, et al. Occurrence of *Grapevine leafroll-associated viruses* in China [J]. Phytopathology, 2013, 97(10): 1339 - 1345.

(责任编辑: 田 喆)