

## 研究简报

## Research Notes

# 侵染‘舞美’苹果的苹果锈果类病毒检测与全序列分析

刘洪玉, 孙子豪, 李保华, 王彩霞\*

(青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109)

**摘要** 2017年9月,在山东胶州调查苹果病毒病时发现‘舞美’果实表现出明显的花脸症状,取发病树体芽组织嫁接于健康‘富士’苹果幼树上,采用RT-PCR技术对其是否含有苹果锈果类病毒进行了检测,并利用DNAMAN、MEGA 5.1等软件对其全序列进行了分析。结果表明,显症‘舞美’果实、发病树体枝条及嫁接‘富士’枝条中均可检测出ASSVd,无症状‘舞美’果实和相应树体枝条中均未检测到ASSVd。‘舞美’分离物基因组主流序列为333 nt(登录号MG745387),与GenBank中已报道的ASSVd序列一致性为92%~99%。序列多重比对及系统进化树分析发现,该分离物的末端保守区和中央保守区与ASSVd参考序列一致,且与不同来源的ASSVd分离物亲缘关系较近。这是首次在‘舞美’苹果上发现和鉴定出苹果锈果类病毒。

**关键词** 苹果锈果类病毒; ‘舞美’; RT-PCR; 序列分析

**中图分类号:** S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018233

## Detection and full sequence analysis of *Apple scar skin viroid* in ‘Maypole’ apple

LIU Hongyu, SUN Zihao, LI Baohua, WANG Caixia

(Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract** In September 2017, ‘Maypole’ fruits with typical dappling and scarring symptoms were found during the investigation of apple virus diseases in Jiaozhou, Shandong. The buds from diseased ‘Maypole’ tree were grafted on the healthy ‘Fuji’ apple tree. *Apple scar skin viroid* (ASSVd) was detected by using RT-PCR method. The full nucleotide sequence of the isolate was analyzed by DNAMAN and MEGA 5.1 software. The results showed that ASSVd was detected in the symptomatic ‘Maypole’ fruits, branches from the tree with diseased fruits and ‘Fuji’ apple tree grafted with diseased buds, while no ASSVd was detected in the asymptomatic ‘Maypole’ fruits and branches in the corresponding tree. The dominant sequences of ‘Maypole’ isolate comprised 333 nucleotides (GenBank accession no. MG745387), which shared 92% to 99% identity with other ASSVd sequences registered in the GenBank. Multiple alignment and phylogenetic tree analysis of ASSVd nucleotide sequences revealed that the terminal conserved region (TCR) and central conserved region (CCR) of this isolate were identical with those of the reported reference sequences. In addition, the ‘Maypole’ isolate was closely related with other ASSVd isolates from different sources. For the first time, ASSVd was found and identified in ‘Maypole’.

**Key words** *Apple scar skin viroid*; ‘Maypole’; RT-PCR; sequence analysis

苹果锈果病在辽宁<sup>[1]</sup>、新疆<sup>[2]</sup>、山东<sup>[3]</sup>、河北<sup>[4]</sup>等为制约我国苹果产业健康发展的主要限制因子。该病的病原为苹果锈果类病毒 *Apple scar skin viroid* 苹果主产区均有发生,近年来呈不断蔓延趋势,已成

收稿日期: 2018-06-01

修订日期: 2018-11-14

基金项目: 国家现代农业(苹果)产业技术体系(CARS-28);青岛农业大学大学生创新训练项目

\* 通信作者 E-mail: cxwang@qau.edu.cn

(ASSVd), 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科 *Pospiviroidae* 苹果锈果类病毒属 *Apscarviroid*<sup>[5]</sup>。ASSVd 基因组为单链环状 RNA, 约 330 个核苷酸, 存在于细胞核内, 具有自我复制能力, 可形成稳定的棒状二级结构, 具有一个中央保守区(CCR)和一个末端保守区(TCR)<sup>[6]</sup>。苹果锈果类病毒除侵染苹果外, 还可危害梨<sup>[7]</sup>、桃<sup>[8]</sup>、杏<sup>[9]</sup>等, 在果实表面产生锈状斑、花脸、畸形等症状, 导致果实丧失商品价值, 造成严重经济损失<sup>[4]</sup>。ASSVd 主要通过嫁接、带病毒苗木等传播, 尚未发现其昆虫传播介体<sup>[10]</sup>。因此, 繁育和应用无病毒苗木是生产中防治木本植物病毒病害的最有效措施。

目前, 苹果锈果类病毒的检测方法主要为生物学症状观察和分子生物学检测技术<sup>[4]</sup>。ASSVd 属于非潜隐性病毒, 但发病症状仅表现在果实上, 且常由于环境条件、品种等因素影响, 导致发病症状差异较大。由于生物学鉴定周期长, 等症状出现, 已经造成无法挽回的损失<sup>[4, 11]</sup>。分子生物学方法主要包括常规 RT-PCR、实时定量 PCR、斑点杂交等<sup>[4, 10-11]</sup>, 这些方法具有检测灵敏度高、特异性强、快速等优点, 且适用于大批量样品的检测, 在田间病害的早期诊断及无病毒种苗繁育中得到广泛应用。

芭蕾苹果(ballerina apple)又称柱型苹果(columnar apple), 是 20 世纪 90 年代从英国引进的新优苹果品种, 其中包括一些观赏型品种, 如‘舞美’(Maypole)<sup>[12]</sup>。该品种由威塞克自然杂交实生苗中选出, 花冠为艳丽的胭脂红色, 花期长, 极具观赏价值; 果实圆形或圆锥形, 单果重约 35 g, 大小整齐, 成熟时着全面橙红色, 鲜艳美观, 而且果实可用来加工果酱、果汁和果茶等, 用途非常广泛。2017 年 9 月份, 在山东胶州果园调查苹果病毒病时发现部分‘舞美’果实表现出明显的花脸症状, 采集发病果实及发病树体 1~2 年生枝条, 取芽组织嫁接在青岛农业大学试验田健康‘富士’苹果幼树上, 提取样品总 RNA 进行 RT-PCR 检测和测序分析, 均证实‘舞美’被苹果锈果类病毒所侵染, 这是首次在该苹果品种上发现和鉴定 ASSVd。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料: 2017 年 9 月, 在山东胶州商业苹果园中采集表现花脸症状的‘舞美’果实和发病树体的 1~2 年生枝条, 取芽组织嫁接在青岛农业大学试验田健康‘富士’苹果(无毒苗栽植, 且嫁接前进行了 ASSVd 检测)幼树上。RT-PCR 所用阴性对照为健康组培苗, 阳性对照为本实验室嫁接保存的带毒‘富

士’幼树。

菌株与试剂: 植物柱式总 RNA 抽提纯化试剂盒和氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、Prime STAR Max DNA Polymerase、pMD 18-T 克隆载体购自 TaKaRa(大连)有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、DNA Marker 购自擎科梓熙(青岛)生物公司; 大肠杆菌菌株 DH5α 由本实验室保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

取 0.2 g 果皮和枝条皮层组织, 用液氮研磨后参照植物柱式总 RNA 抽提纯化试剂盒说明书提取总 RNA, 其浓度和质量通过 P330 超微量分光光度计(德国 Implen 公司)检测后保存于 -80℃ 备用。cDNA 第一链的合成参照 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书, 以 1 μg 总 RNA 为模板, Oligo (dT)<sub>18</sub> 为引物, 反转录成 cDNA, 保存于 -20℃ 备用。

#### 1.2.2 RT-PCR 检测

参照赵英和牛建新<sup>[3]</sup>的报道合成 ASSVd 的检测引物, ASSVd-dete-F: 5'-CAGCACACAGGAA-CCTCACGG-3'; ASSVd-dete-R: 5'-CTCGTCGT-CGACGAAGG-3'。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μL 扩增体系包括: 12.5 μL 2× Prime STAR Max DNA Polymerase, 正向和反向引物各 0.5 μL, 模板 cDNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 4 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

#### 1.2.3 ASSVd 的全长克隆

根据朱慧<sup>[13]</sup>的报道合成 ASSVd 的全长引物, ASSVd-full-F: 5'-GACGAAGGCCGGTGAGAAAG-3'; ASSVd-full-R: 5'-GACGACGACAGGTGAGTTCC-3'。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行目的片段的回收纯化, 并与载体 pMD 18-T 连接, 热击转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆提取质粒, 送交青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

#### 1.2.4 序列分析及系统进化树构建

将 ASSVd 全长序列通过 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的 BLAST 进行同源性比对, 选择具有代表性序列利用 DNAMAN 进行多重比对分析。运用 MEGA 5.1 软件的

邻接法 (neighbor-joining, NJ), 重复次数为 1 000, 构建系统发育树。

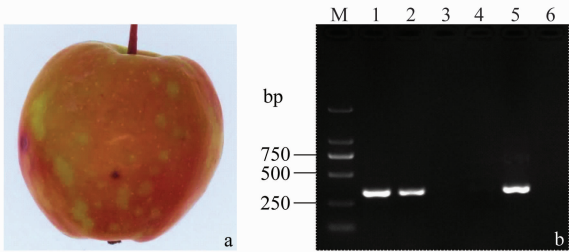
2 结果与分析

2.1 ASSVd 的 RT-PCR 检测

以表现花脸症状‘舞美’果实(图 1a)和其他样品 cDNA 为模板,利用 ASSVd 检测引物进行 PCR 扩增。图 1b 结果显示,显症‘舞美’果实和发病树体枝条中均可扩增到约 300 bp 的特异性条带,与 ASSVd 阳性对照样品的目标条带大小一致;无症状‘舞美’果实和相应树体枝条及健康组培苗中均未扩增到该条带。将发病树体芽组织嫁接于健康‘富士’幼树,2018 年 4 月份进行 RT-PCR 检测,均可扩增到上述特异性条带(图略),表明显症‘舞美’苹果确实被 ASSVd 侵染。

2.2 ASSVd 序列测定与多重比对分析

利用全长 ASSVd 引物进行扩增,PCR 产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体,对 6 个单克隆进行测序。结果表明,所得序列全长为 331~333 bp,与 GenBank 中已报道的 ASSVd 基因组核苷酸序列一致性为 92%~99%。所测序的 6 条 ASSVd 序列中,有 4 条序列完全一致,作为侵染‘舞美’苹果的主流序列提交 GenBank(序列号 MG745387),另外两条序列缺少 1~2 个碱基。



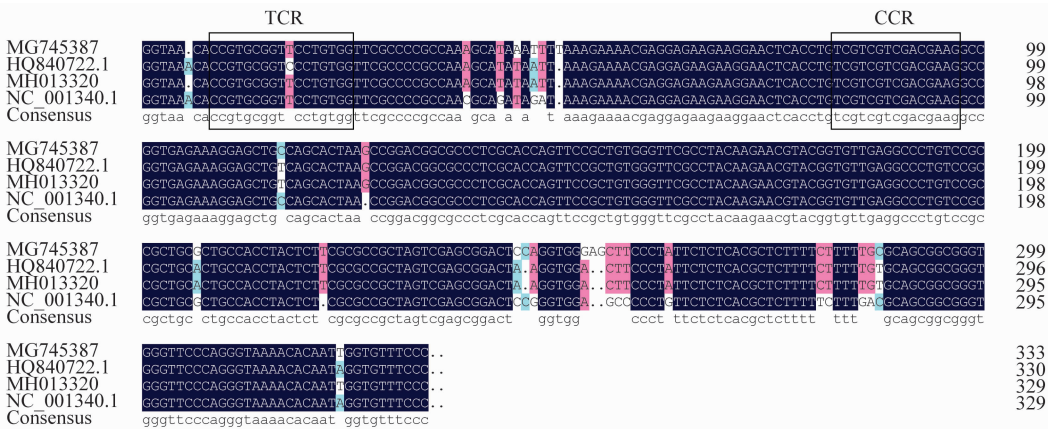
a: 显症‘舞美’果实; b: RT-PCR 检测 ASSVd, M: DNA Marker DL2000; 1: 显症‘舞美’果实; 2: 发病树体枝条; 3~4: 无症状‘舞美’果实和枝条; 5~6: 阳性和阴性对照

a: Symptomatic ‘Maypole’ fruit; b: Detection of ASSVd by RT-PCR, M: DNA Marker DL2000; 1: Symptomatic ‘Maypole’ fruit; 2: Branch from the tree with diseased fruit; 3-4: Asymptomatic ‘Maypole’ fruit and branch from the corresponding tree; 5-6: Positive and negative control

图 1 ‘舞美’果实发病症状与苹果锈果类病毒 RT-PCR 检测

Fig. 1 Dapple apple symptoms on ‘Maypole’ fruit and detection of ASSVd by RT-PCR

将测序的主流序列(MG745387)与北京分离物(HQ840722.1)和山东分离物(MH013320)及标准 ASSVd(NC\_001340.1)序列进行多重比对分析,结果(图 2)显示,4 个 ASSVd 序列一致性达 96%,在苹果锈果类病毒属的末端保守区(TCR)及中央保守区(CCR)内,仅北京分离物在第 17 个核苷酸位点有 T-C 突变。变异位点主要集中在第 38 位—第 50 位的左末端区(TLR)交界处,及第 251 位—第 279 位的致病区(P 区)。侵染‘舞美’的 ASSVd 序列在第 49 位、第 253 和 254 位,分别特异性插入 T、A 和 G 碱基。



MG745387 为侵染‘舞美’的 ASSVd 序列; HQ840722.1 为北京分离物; MH013320 为山东分离物; NC\_001340.1 为 ASSVd 标准序列。黑色框内为苹果锈果类病毒属成员的两个保守区域

MG745387 is a sequence of ASSVd infecting ‘Maypole’; HQ840722.1 is an ASSVd sequence from Beijing; MH013320 is an ASSVd sequence from Shandong; NC\_001340.1 is a reference sequence of ASSVd. Black boxes represent two conservative regions of apscarviroid

图 2 侵染‘舞美’ASSVd 序列与其他 3 个中国 ASSVd 分离物序列多重比对

Fig. 2 Multiple alignment of ASSVd sequences from ‘Maypole’ and other three Chinese isolates

2.3 ASSVd 系统进化树分析

利用 NCBI 的 BLASTn 进行同源性搜索,选取 10 个来自不同国家和地区 ASSVd 序列,采用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树,1 000 次循环计

算系统发育树中节点的自举置信水平。由图 3 可知,侵染‘舞美’分离物 ASSVd 序列与新疆分离物(KC110860.1)聚在一个分支,说明其亲缘关系较近,且与 ASSVd 标准菌株聚在一个大分支中。与北京分

离物(HQ840722. 1)和山东分离物(MH013320)聚在不同的分支,说明其亲缘关系相对较远。

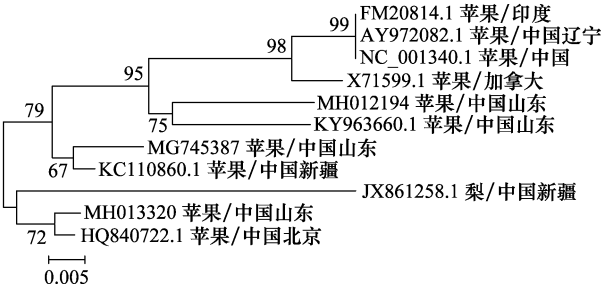


图 3 来源于‘舞美’的 ASSVd 序列与其他分离物 ASSVd 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ASSVd sequences from ‘Maypole’ and other isolates

3 讨论

近年来,苹果锈果类病毒病在我国的发生率逐年提高,已成为苹果产业健康发展的限制性因子,引起了有关研究者的高度重视<sup>[10-11, 14-15]</sup>。课题组对山东苹果产区病毒病发生情况进行调查时发现,胶州新建幼树园中的部分‘舞美’果实表现出典型的花脸症状。本研究利用 RT-PCR 技术对‘舞美’果实和枝条进行了 ASSVd 检测,研究发现,显症‘舞美’果实和相应发病树体枝条中均可检测到 ASSVd,而未显症果实和相应树体枝条中没有 ASSVd 特异性条带,表明 RT-PCR 检测结果与发病表型症状相一致。9 月份将 ASSVd 检测阳性的枝条,芽接于健康‘富士’幼树,第二年 4 月份,在嫩梢中可检测到 ASSVd,进一步证实‘舞美’受到 ASSVd 的侵染。这是首次在‘舞美’苹果上发现并检测到 ASSVd。

通过对‘舞美’分离物进行克隆和序列分析发现,其基因组主流序列由 333 个核苷酸组成,具有苹果锈果类病毒属中央保守结构序列和末端保守区。该分离物序列与新疆分离物(KC110860. 1)一致性最高达 99%,而与北京分离物(HQ840722. 1)和山东分离物(MH013320)一致性不足 95%;系统进化树分析结果显示,‘舞美’与新疆分离物(KC110860. 1)聚在一个分支,说明其亲缘关系较近,而与北京分离物(HQ840722. 1)和山东分离物(MH013320)聚在不同的分支,表明其亲缘关系相对较远。

芭蕾苹果‘舞美’具有重要的观赏价值,且果实能够深加工,近年来推广种植面积不断增加<sup>[12]</sup>。ASSVd 侵染‘舞美’后引起果实表面着色不均,产生明显的花脸症状,严重降低了其观赏性和经济价值,并且可能成为类病毒的传播源头,给其他栽培品种造成无法挽回的经济损失。课题组将进一步调查 ASSVd 在山东及我国其他苹果产区的发生情况,为及时采取措施有效控制苹果锈果病的发生与危害提供科学依据。

参考文献

[1] 郭瑞,李世访,董雅凤,等. 苹果锈果类病毒辽宁分离物的克隆与序列分析[J]. 植物病理学报,2005,35(5):472-474.

[2] 马伟,姜冬梅,陈丽芳,等. 苹果锈果类病毒山东栖霞分离物的分子鉴定及序列分析[J]. 植物保护,2011,37(2):91-94.

[3] 赵英,牛建新. 苹果锈果类病毒新疆分离物的克隆和序列分析[J]. 果树学报,2006,23(6):896-898.

[4] 吴然,李君英,邵建柱,等. 苹果锈果类病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 果树学报,2015,32(1):150-155.

[5] PUCHTA H, LUCKINGER R, YANG X, et al. Nucleotide sequence and secondary structure of *Apple scar skin viroid* (ASSVd) from China [J]. Plant Molecular Biology, 1990, 14 (6): 1065-1067.

[6] KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. London: Elsevier Academic Press, 2012: 1367-1368.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 赵英,牛建新. 新疆杏树苹果锈果类病毒的检测与全序列分析[J]. 园艺学报,2008,35(6):805-810.

[10] 邢飞,张志想,陈策,等. 北京平谷区苹果锈果类病毒检测初报[J]. 植物保护,2016,42(6):139-142.

[11] 陈冉冉,谢吉鹏,叶婷,等. 我国部分苹果产区苹果锈果类病毒的检测与全序列分析[J]. 植物保护,2017,43(6):97-102.

[12] 李光晨. 观赏型芭蕾苹果品种‘舞美’[J]. 北京农业,1997 (1):31.

[13] 朱慧. 来源梨的苹果褪绿叶斑病毒和两种类病毒的分子特性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2014.

[14] 吕文霞,张志想,姜冬梅,等. 苹果锈果类病毒北京分离物的检测与序列分析[J]. 植物保护学报,2013,40(5):477-478.

[15] 吴宽,赵磊,孙丽英,等. 苹果锈果类病毒陕西秦冠分离物的鉴定与序列分析[J]. 植物保护学报,2016,43(5):877-878.

(责任编辑: 杨明丽)