

苹果茎痘病毒基因变异及重组分析

李丽丽¹, 杨洪一^{2*}, 来永才³

(1. 黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081;

2. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;

3. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)是一种严重危害果树生产的潜隐性病毒, 为了解 ASPV 的变异特点, 基于已报道的 ASPV 外壳蛋白(coat protein, CP)基因核苷酸序列信息, 结合 RNA 二级结构分析, 对 ASPV 的变异进行分析。结果显示, 不同分离物 CP 基因前半部分区域存在 3 个大段的空位区。中国分离物 PR1 在 CP 基因末端有 12 个核苷酸的序列插入, RNA 二级结构预测显示, 插入点附近能形成一个稳定的茎环结构, 序列插入并未引起 RNA 二级结构的明显变化。重组分析显示, 波兰分离物 ST181 为中国分离物 WS 和波兰分离物 N1 的重组体, 系统进化分析支持该重组事件的发生。ASPV 核苷酸序列变异复杂, 并能够发生重组, 因而有必要收集更多抗性资源, 加强抗病育种。

关键词: 苹果茎痘病毒; 变异; 重组; RNA 二级结构

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0102-04

Analysis of Variation and Recombination of Apple Stem Pitting Virus

LI Li-li¹, YANG Hong-yi^{2*}, LAI Yong-cai³

(1. Institute of Forestry Science of Heilongjiang Province, Harbin 150081, China;

2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3. Crop Tillage and Cultivation Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Apple stem pitting virus(ASPV) is one of the most important latent viruses that infect fruit trees. In order to understand the variation character of ASPV, the variation of ASPV was analyzed in the study on the basis of the nucleotide sequences of coat protein(CP) gene of various isolates and RNA secondary structure. The results indicated that there were three large blank regions in the frontal region of CP gene for various isolates. There was a 12-nt insertion in the terminal of CP gene for Chinese isolate PR1. In addition, a stable stem-loop structure could be formed for the sequences near the place of insertion, and the RNA secondary structure did not show distinct change on account of the insertion. Recombination analysis showed that the isolate ST181 was a product of recombination between isolate WS from China and isolate N1 from Poland, and the recombination was also supported by phylogenetic analysis. To our knowledge, this is the first report for recombination of ASPV. The variation of ASPV is complicated and recombination of genome is also found, so more anti-ASPV resources need to be collected and the anti-ASPV breeding needs to be strengthened.

Key words: apple stem pitting virus(ASPV); variation; recombination; RNA secondary structure

收稿日期: 2013-10-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目(DL13EA06-3)

作者简介: 李丽丽(1978-), 女, 辽宁阜新人, 助理研究员, 博士, 主要从事经济林研究。

* 通讯作者: 杨洪一(1978-), 男, 吉林九台人, 副教授, 博士, 主要从事微生物学研究。E-mail: yhyil@sohu.com

苹果茎痘病毒 (apple stem pitting virus, ASPV) 最早于 1954 年在美国的森林苹果 (*Malus sylvestris*) 上被发现, 后来西欧、东亚、南美、澳大利亚等地区也有较多报道^[1-2]。ASPV 主要侵染苹果和梨, 自然寄主是森林苹果、三叶海棠 (*M. sieboldii*)、梨属 (*Pyrus*) 及花楸属 (*Sorbus*) 植物, 近年来也有侵染毛樱桃 (*Cerasus tomentosa*) 和榲桲 (*Cydonia oblonga*) 的报道^[3-4]。ASPV 在一些敏感的砧木和栽培品种上症状较明显, 主要表现为叶片反卷、木质部茎痘斑、果实凹陷、叶偏上性生长等^[2], 梨石痘病 (pear stony pit)、梨脉黄病 (pear vein yellow)、梨红色斑驳病 (pear red mottle) 等多种病症都是由 ASPV 侵染引起的。

当前对植物病毒病尚无有效的治疗药剂, 因而在生产中主要通过抗病育种来控制病毒危害。然而, 生产中的一些抗性资源可能因病毒发生分子变异或重组而失去抗性, 因而了解病毒分子变异特点对抗病育种具有重要意义。外壳蛋白 (coat protein, CP) 是病毒的结构蛋白, 与寄主病症、血清学特性等密切相关, 常被用作分析病毒分子变异的目标基因。目前已有多个 ASPV 分离物的 CP 基因核苷酸序列被公布, 显示其核苷酸序列变异较复杂^[5]。基于已报道的核苷酸序列信息, 本研究对 ASPV 的变异特点进行分析, 并利用重组分析软件分析病毒的重组特点, 以期通过抗病育种控制 ASPV 危害提供依据。

1 材料和方法

1.1 病毒核苷酸序列信息

在 GenBank 中获取 21 个 ASPV 分离物的 CP 基因核苷酸、氨基酸全序列, 并获取寄主及分离地区相关信息。不同分离物的 GenBank 登录号、寄主及地理起源见表 1。

1.2 变异分析

利用软件 ClustalX 1.83 进行多序列比对 (multiple sequence alignment), 并通过手工比对对空位区进行调整。利用软件 MEGA 4.0 进行系统进化分析, 以桃褪绿斑驳病毒 (peach chlorotic mottle virus, PCMV) (GenBank 登录号: NC_009892) 作为外群。

利用软件 RNA Structure 4.6 进行 RNA 二级结构预测。

1.3 重组分析

利用软件 Recombination Detection Program (RDP) 3.4 中的 RDP、GENECONV、BootScan、SiScan 算法, 对 ASPV 分离物的 CP 基因序列进行

重组分析。

表 1 不同 ASPV 分离物的寄主及地理起源

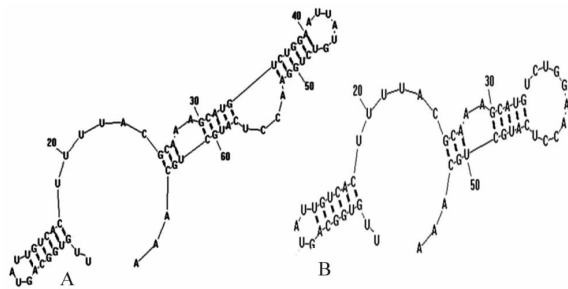
分离物	寄主	国家	GenBank 登录号
PR1	梨	中国	EU095327
ST54	梨	波兰	AF345892
GNKVII 34	梨	波兰	AF345893
ST132	梨	波兰	AF345894
ST113	梨	波兰	AF345895
GNK III/45	梨	波兰	AF491929
PSA-H	梨	德国	D21828
IF38	苹果	日本	AB045371
MT24	苹果	波兰	AF438522
N1	苹果	波兰	AF491931
ST181	苹果	波兰	AF495382
PA66	苹果	德国	D21829
MHCzAp	苹果	捷克	DQ003336
MT32	苹果	波兰	AF438521
br1	苹果	巴西	AY572458
jf5	苹果	中国	FJ619187
jf1	苹果	中国	FJ619188
jf4	苹果	中国	FJ619184
jf3	苹果	中国	FJ619185
jf2	苹果	中国	FJ619186
WS	苹果	中国	EU314950

2 结果与分析

2.1 ASPV 变异分析

对 21 个 ASPV 分离物 CP 基因序列进行多序列比对, 发现较多分离物比对后存在空位, 通过手工比对来对空位区域进行调整, 结果显示, 21 个分离物 CP 基因核苷酸序列的后半部分区域高度保守, 前半部分区域存在 3 个大段的空位区。不同分离物 CP 基因核苷酸序列差异较大, 其中巴西分离物 br1 较其他分离物缺失了 60 个核苷酸 (nt), 而德国分离物 PA66 分别在不同位点比其他分离物多了约 60 nt, 序列分析显示, 插入序列与 GenBank 中已报道的序列无相似性。

中国分离物 PR1 在 CP 基因末端有 12 nt (TTATGTCTGGAA) 的序列插入, 该序列可在海洋球石藻特异性病毒 (*Emiliania huxleyi* virus, EhV) 中发现, 此外, 插入位点附近的序列 (AT/CGTC/TTGGAA) 与插入序列高度相似, 其具体功能未知。RNA 二级结构预测显示, 插入点附近能形成一个稳定的茎环结构 (图 1), 插入点区域序列位于发夹环顶端, 插入序列倾向于使茎环结构更稳定 (自由能由 -14.2 kcal/mol 变为 -18.6 kcal/mol)。



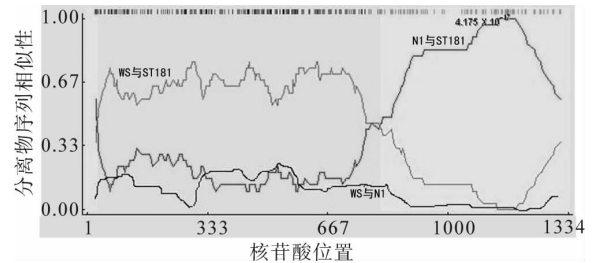
A. 包含插入序列(UUAUGUCUGGAA)的 RNA 二级结构,
插入序列位于核苷酸序列第 42—53 位处;
B. 无插入序列的 RNA 二级结构

图 1 序列插入区 RNA 二级结构预测结果

2.2 基于 CP 基因序列的 ASPV 重组分析

利用软件 RDP 3.4 中的不同算法,对 21 个 ASPV 分离物的 CP 基因序列进行了重组分析,一些潜在的重组事件被发现。中国分离物 WS 与波兰分离物 N1 发生了重组, SiScan、BootScan、RDP 的 P 值分别为 9.6×10^{-14} 、 1.4×10^{-16} 、 4.2×10^{-17} (图 2); 波兰分离物 ST181 为中国分离物 WS 和波兰分离物 N1 的重组体,重组位点位于 CP 基因 722 nt 附近(图 3)。分离物 ST181 CP 基因的前半部分与分离物 WS 的核苷酸序列同源为 87.9%,后半部分与分离物 N1 的核苷酸序列同源为 98.1%。利用

MEGA 4.0 软件中的邻近聚类算法,分别基于 ASPV CP 基因中重组位点前、后两部分核苷酸序列进行系统进化分析,结果显示,所获得的进化树大体相似,主要差异之处在于不同的系统进化树中分离物 ST181 的位置发生了变化,分别与分离物 WS 和 N1 聚集成一簇,形成 1 个小的进化枝,进一步证明了重组事件的发生(图 4)。



右上部数据(4.175×10^{-17})为 P 值

图 2 RDP 算法的重组分析结果

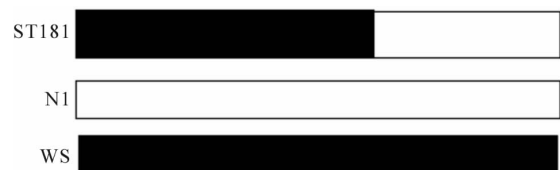
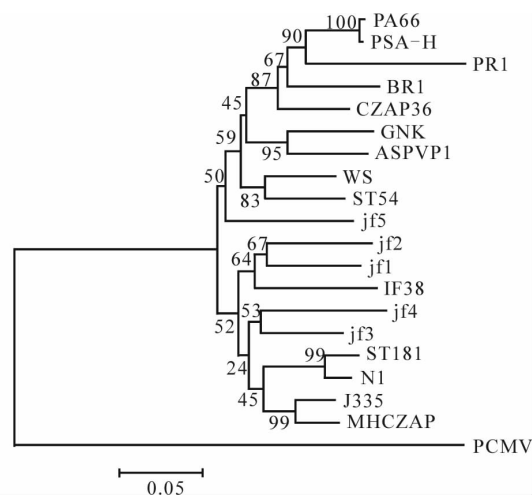
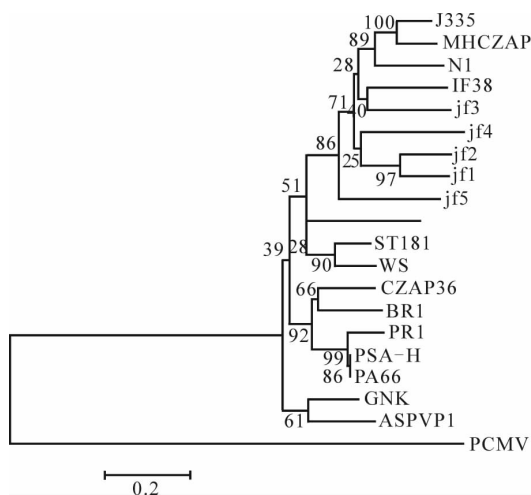


图 3 2 个 ASPV 分离物的重组轮廓



左、右图分别为基于重组位点前、后核苷酸序列的系统进化树,PCMV 作为外群

图 4 基于 ASPV CP 基因不同区域的进化树比较

3 讨论

RNA 病毒复制过程中缺乏校正功能,核苷酸序列变异复杂,但一般 RNA 二级结构相对保守,核苷酸序列变异一般不引起 RNA 二级结构的变化,因而在一些核苷酸序列插入、缺失较复杂的变异分析中, RNA 二级结构可辅助进行多序列比对。此外,

RNA 二级结构对于不同病毒分离物的系统进化分析也具有重要意义,因此, RNA 二级结构是分析病毒分子变异的重要工具。

早期人们认为重组仅限于遗传物质为 DNA 的生物,近年来发现,重组在基因组为 DNA 和 RNA 的植物病毒中皆可发生,重组已成为 RNA 病毒进化的主要因素。重组一般分为同源重组和非同源重

组,同源重组发生在相同或非常相近的 2 个序列间,非同源重组发生在较低有或无明显同源性的序列间^[6]。重组是病毒进化的主要动力^[7],在双生病毒、马铃薯 Y 病毒属成员中发生较频繁,病毒通过重组可获得新基因,从而增加对寄主的适应性,使其抗性基因失效。由于 RNA 病毒复制过程中错配率较高,通过重组修复可使病毒基因维持原功能。目前也有较多非同源重组的报道,如在马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)中发现烟草叶绿体 DNA 外显子同源序列,在长线形病毒属(*Closterovirus*)成员的基因中有编码类似热激蛋白 70 (HSP70)的序列^[5]。在自然界中,病毒 RNA 重组是普遍和随机的,但只有一小部分重组体能够存活下来,可能是由于一种类似“瓶颈”效应的正选择作用机制不断地筛选和去除有害突变^[5,8]。复合侵染的相关病毒、同种病毒不同分离物间可发生基因交换,产生适应性更强的突变株,本研究中所发现的同源重组事件可能属于此类。发生重组的 2 个 ASPV 分离物的地理区域相距较远(中国和波兰),从地理角度来看这 2 个分离物间不容易发生重组,但分离物 WS 分离自国家苹果种质资源圃(兴城),由于 ASPV 为潜隐病毒,日益广泛的种质资源交流可能导致了不同 ASPV 分离物的重组及传播。

参考文献:

- [1] Kundu J K. The application of RT-PCR assay for the detection of apple stem pitting virus and apple stem grooving virus in four apple cultivars[J]. Plant Protection Science, 2002, 38(1): 13-17.
- [2] Jelkmann W. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses [J]. Journal of General Virology, 1994, 75: 1535-1542.
- [3] Dhir S, Tomar M, Thakur P, et al. Molecular evidence for *Apple stem pitting virus* infection in India [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 393.
- [4] Mathioudakis M M, Maliogka V I, Dovas C I, et al. First record of the apple stem pitting virus (ASPV) in quince in Greece [J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(2): 225.
- [5] Zhao Y, Liu N, Niu J X. A study of the distribution of *Apple stem pitting virus* in tissues of pear tree using in situ hybridization and in situ RT-PCR [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8: 1351-1359.
- [6] 刘金亮. 四种马铃薯 Y 病毒属病毒的分子变异及 HC-Pro 结构对抑制 RNA 沉默的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [7] Roossinck M J, Zhang L, Hellwald K. Nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA3 indicate radial evolution of three subgroups [J]. Journal of Virology, 1999, 73: 6752-6758.
- [8] Li H, Roossinck M J. Genetic bottle necks reduce population variation in an experimental RNA virus population [J]. Journal of Virology, 2004, 78: 10582-10587.