

柑桔木质陷孔病类病毒贵州分离物的分子鉴定*

王雪峰^{1,2}, 唐科志², 李中安², 周彦², 兰建强^{1**}, 周常勇^{2**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 西南大学 柑桔研究所, 重庆 北碚 400712)

摘要: 从采自贵州感染了啤酒花矮化类病毒 (*Hop stunt viroid*, HSVd) 的柑桔植株中抽提总核酸, 通过一对鉴别引物, 经 RT-PCR 扩增初步筛选出柑桔木质陷孔病类病毒 (*Citrus cachexia viroid*, CCaVd)。扩增该类病毒的全长核苷酸片段, 通过克隆和测序, 结果发现, 该片段全长 298 bp, 与 GenBank 中报道的木质陷孔病类病毒分离物同源性达到 96% 以上。这是中国发生的木质陷孔病类病毒的分子生物学特征的首次报道。

关键词: 柑桔木质陷孔病类病毒; 啤酒花矮化类病毒; RT-PCR; 分子生物学特征

中图分类号: S 436.661.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2009) 02-0181-04

Molecular Identification of Guizhou Isolate of Citrus Cachexia Viroid

WANG Xue-feng, TANG Ke-zhi, LI Zhong-an, ZHOU Yan,
LAN Jian-qiang, ZHOU Chang-yong

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
2. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China)

Abstract *Citrus cachexia viroid* (CCaVd) was detected from *hop stunt viroid* (HSVd) infected citrus collected from Guizhou by RT-PCR with a discrimination primer pair. The full-length fragment of the CCaVd isolate was amplified by a pair of specific primer. Cloning and sequencing of the fragment revealed it was 298 bp long with above 96% identity compared with reported sequences of CCaVd in GenBank. This is the first report on the molecular characteristics of CCaVd in China.

Key words *Citrus cachexia viroid*; *Hop stunt viroid*; RT-PCR; Molecular characteristics

柑桔木质陷孔病类病毒 (*Citrus cachexia viroid*, CCaVd) 是引起柑桔病害的一类重要病原因子, 主要为害宽皮柑桔、宽皮柑桔的某些杂交种 (桔橙和桔柚)、阿来檬、兰普来檬和金柑, 引起植株矮化、褪绿, 严重时甚至全株死亡^[1,2]。

柑桔木质陷孔病类病毒属于啤酒花矮化类病毒 (*Hop stunt viroid*, HSVd) 核苷酸序列变异株中

的一类, 主要包括柑桔类病毒-IIb (CVd-IIb) 和柑桔类病毒-IIc (CVd-IIc)^[2,3]。CCaVd 与非 CCaVd 的 HSVd 变异株在可变区 (Variable domain, V 区) 上有 5~6 个核苷酸的差异, 这些核苷酸位点的差异在很大程度上决定了 HSVd 变异株的致病力强弱^[4,5]。木质陷孔病主要分布在地中海地区, 在其它不少地区亦有发生。RIZZA

收稿日期: 2008-04-24 修回日期: 2008-09-02

* 基金项目: 重庆市自然科学基金项目资助 (CSTC 2006BB1351; CSTC 2008BB1271)。

作者简介: 王雪峰 (1979-), 男, 浙江安吉人, 硕士, 助理研究员, 主要从事柑桔病毒学研究。

E-mail: xfwang1979412@sina.com

** 通讯作者 Corresponding author 兰建强 (1962-), 男, 四川冕宁人, 副教授, 主要从事电子显微镜技术与生物源农药研究。E-mail: jld@ sina.com;

周常勇 (1965-), 男, 湖南安仁人, 研究员, 博士生导师, 主要从事柑桔病害分子生物学研究。

E-mail: zhouchangyong@vip.sina.com

等^[6]首次检测到我国湖南省有该病发生,但未见进一步研究报道。本研究应用鉴别引物,利用 RT-PCR 技术,从收集的 90 个 HSVd 毒源中检测到一个 CCaVd 分离物,将其命名为 Ca-GZ-01,并对其分子生物学特征进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料

HSVd 分离物采自四川省眉山市、重庆市北碚区、贵州省罗甸县和江西省赣州市,寄主为甜橙、宽皮柑桔及其杂交种。所有分离物嫁接接种于甜橙实生苗,保存于西南大学柑桔研究所网室。CCaVd 阳性对照由土耳其 Çukurova 大学 ÖNELGE 博士提供。

1.2 引物设计

根据 YANG 等^[7]设计的引物 HSVd-R: CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT 和 HSVd-F: GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC, 扩增 HSVd 的全长序列,片段大小约为 302 bp,参照 BERNAD 和 DURAN-VILA^[8]设计的 HSVd 株系鉴别引物 CCaVd-R: GGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGTC 和 CCaVd-F: GAATCCAGCGGGGCGTG, 来区分木质陷孔病和非木质陷孔病,扩增片段大小约为 283 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 总核酸提取和一步法 RT-PCR

总核酸的提取参照周常勇等^[9]的微量快速提取法。扩增反应总体积为 10 μ L, 取 1 μ L 总核酸 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立即冰浴, 之后加入 9 μ L 的反应混合液: 1.8 μ L 水, 5 μ L 2 X 缓冲液, 1.6 μ L MgSO₄ (5 mmol/L), 引物各 0.2 μ L (10 μ mol/L) 和 0.2 μ L RT-Taq 酶 (Invitrogen 公司)。RT-PCR 反应在 Bimetra PCR 扩增仪 (德国 Whatman 公

司) 上进行, 50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min 后, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 取 4 μ L 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳检测。

1.4 克隆和序列分析

用 Biospin Gel Extraction Kit (Bioflux 公司) 回收目的 DNA 片段, 将目的片段连接到 pGEM T-easy vector (Promega), 转化大肠杆菌感受态细胞。经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落培养, 提取质粒, 通过 PCR 和酶切鉴定阳性克隆。测序在西南大学柑桔研究所 Beckman 2000XL 测序仪上进行, 测序结果用 DNASTar 整理测序峰值后, 提交到 GenBank。从 NCBI 数据库中下载美国加利福尼亚 CCaVd 分离物 Ca902 (GenBank 登录号: AF213488)、Ca903 (AF131251) 和 Ca905 (又名 CVd-IIc; AF131250), 法国科西嘉岛 X-701 分离物 (AF213484), 西班牙的 X-715 分离物 (AF213501), 以及中国湖南的 CVdII-HN-01 分离物 (EU131154) 的核苷酸序列。序列用 BioEdit7.0 软件进行分析比对。

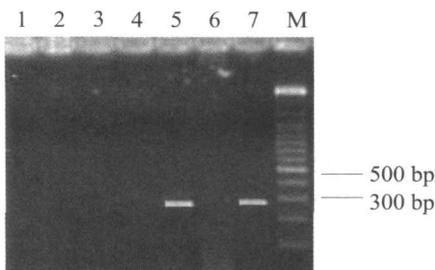
2 结果与分析

2.1 CCaVd 的 RT-PCR 鉴定

利用鉴别引物 CCaVd-R 和 CCaVd-F, 通过 RT-PCR 对毒源库中保存的 HSVd 毒源进行 RT-PCR 检测, 结果在来源于贵州罗甸的纽荷尔脐橙和阳性对照中检测到 283 bp 的特异性条带, 负对照无扩增条带 (图 1)。

2.2 CCaVd 的全长 RT-PCR 扩增

利用引物 HSVd-R 和 HSVd-F, 对所提取的 Ca-GZ-01 分离物总核酸进行 RT-PCR 全长扩增, 得到了 302 bp 的预期条带, 负对照无扩增条带 (图 2)。



1: 蒸馏水对照; 2~4: 分别为四川、重庆和江西的样品; 5: 贵州罗甸样品; 6: 健康样品; 7: 感病样品;

M: 分子量标记; 1: water control; 2~4: samples from Sichuan, Chongqing and Jiangxi; 5: sample from Luodian, Guizhou; 6: healthy sample; 7: infected sample; M: DNA Marker

图 1 CCaVd 与非 CCaVd 鉴别 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of differentiate RT-PCR between Cachexia and non-cachexia variants

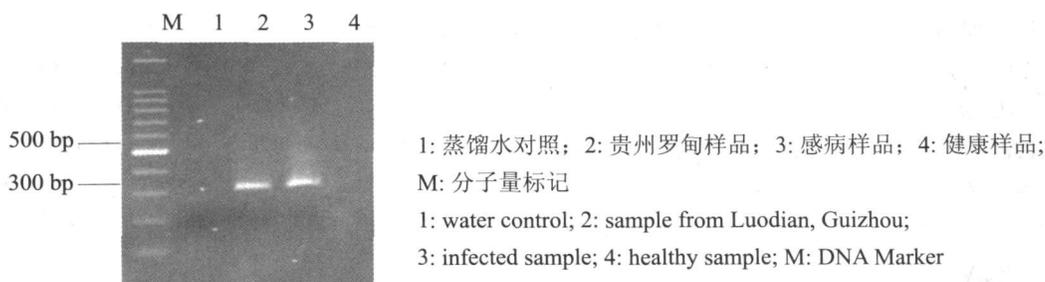


图 2 CCaVd 全长 RT-PCR 扩增结果
Fig. 2 Full-length of CCaVd amplified by RT-PCR

2.3 全长 RT-PCR 产物克隆及序列分析

经 PCR 和酶切鉴定筛选重组阳性克隆进行测序, 结果表明该插入片段为 298bp (GenBank 登录号为 EU104682)。从 NCBI 数据库中下载了来自美国、法国、西班牙的代表性 CCaVd 分离物 (分别属于 CVd-IIIb 和 CVd-IIc), 以及湖南的非 CCaVd 的 HSVd 分离物的核苷酸序列, 与 Ca-GZ-

01 分离物进行比对 (图 3)。结果表明 Ca-GZ-01 与 Ca902, Ca903, X-701 和 X-715 的序列相似性大于 98.3%, 其中与 Ca902 分离物的同源性达到 99.3%; 与 Ca905 (CVd-IIc) 的序列相似性为 96.6%; 与 CVdIIHN-01 的序列相似性为 96.3%。其中阴影部分所示的 5 个核苷酸位点的差异是区分 CCaVd 与非 CCaVd 的主要依据。

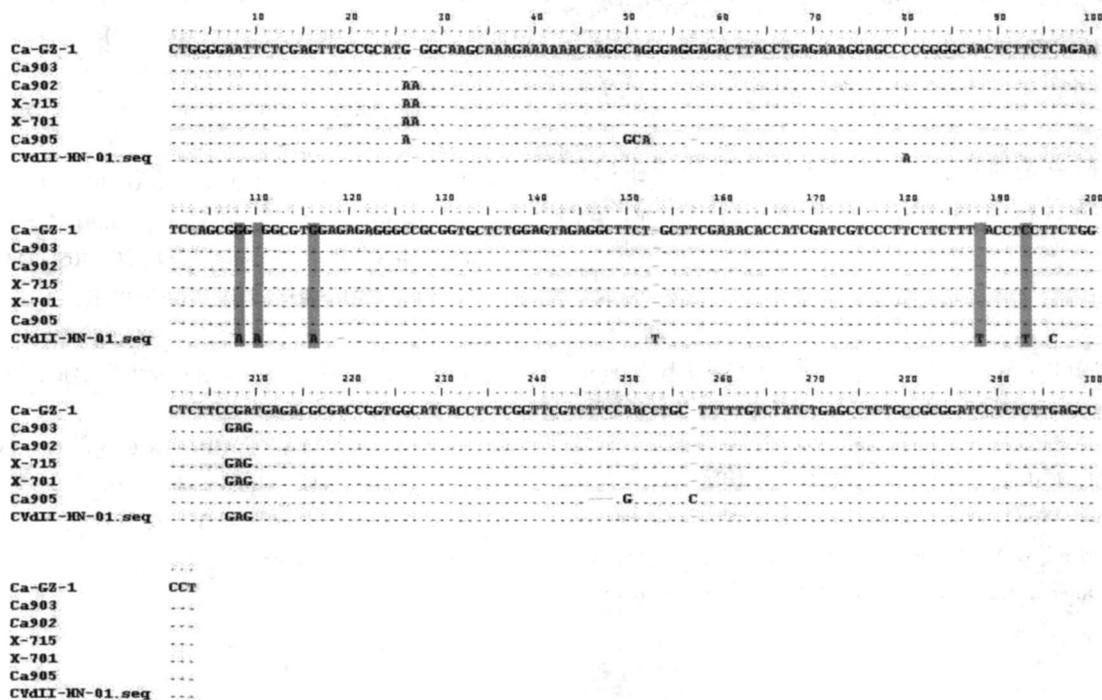


图 3 Ca-GZ-01 分离物与 6 个国内外分离物的全长序列比对结果
Fig. 3 Multiple alignment of full length nucleotide sequences of Ca-GZ-01 isolate with other 6 isolates from abroad and local

3 讨论

柑桔木质陷孔病类病毒的分布较为广泛, 目前在美国、西班牙、土耳其、澳大利亚和日本等

国家都有报道。我国在 2007 年才报道有 CCaVd 的发生^[6], 针对该病在我国的发生、危害、流行规律, 以及分子生物学特征的研究甚少, 因此对该病开展研究显得尤为重要。

HSVd 序列变异株包括 CVd-IIa (302 nt)、CVd-IIb (299 nt) 和 CVd-IIc (297 nt), 其中 CVd-IIb 和 CVd-IIc 属于 CCaVd 变异株, 而 CVd-IIa 则为非 CCaVd 变异株^[10]。CCaVd 变异株与非 CCaVd 变异株在序列上的差异较小, 区分两者的主要依据是 V 区 5 个核苷酸位点的差异 (从非 CCaVd 到 CCaVd A₁₀₇ → G, -A₁₀₉, -A₁₁₅, -U₁₈₈, U₁₉₃ → C)。CVd-IIb 和 CVd-IIc 存在相似的生物学特性, 两者在序列上的差异主要集中在致病区 (Pathogenic domain, P 区) 的核苷酸上^[3]。近年来, 笔者从来源于 4 个省的大量 HSVd 毒源中鉴定筛选到 1 个 CCaVd 分离物 (Ca-GZ-01), 对其扩增后克隆测序, 序列分析表明其与国外已报道的部分 CVd-IIb 分离物序列同源性达到 99% 以上, 与 CVd-IIc 的核苷酸差异主要在 P 区, 且与非 CCaVd 的湖南分离株在 V 区的对应位点上有 5 个核苷酸的差异 (图 3), 表明贵州分离物 Ca-GZ-01 属于 CVd-IIb。同时研究结果也证明我国除湖南外其它地区亦有该病发生, 但其分布可能不广, 目前在田间感染柑桔植株的类病毒中不属于优势种群。

本研究是对中国的 CCaVd 分离物分子生物学特征的首次报道, 将为后续的工作提供研究基础。

[参考文献]

- [1] TMMER LW, GARNSEY SM, GRAHAM JH. *Compendium of Citrus Diseases* (2nd Edn) [M]. APS press, Saint Paul Minnesota 2000
- [2] SEMANCK JS, ROESTACHER CN, DURAN-VILA N. A new Viroid is the Causal Agent of the Citrus Cachexia Disease [C] // Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside California 1988 125-135
- [3] SEMANCK JS, DURAN-VILA N. The Grouping of Citrus Viroids: Additional Physical and Biological Determinants and Relationships with Diseases of Citrus [C] // Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside California 1991 178-187
- [4] PALACIO A, DURAN-VILA N. Citrus Cachexia Disease: Molecular Characterization of Its Viroid Agent [C] // Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside California 2000 273-281
- [5] PALACIO A, ROMERO-DURBAN J, DURAN-VILA N. Characterization of Citrus HSVd Isolates [J]. *Archives of Virology* 2004, 149: 537-552
- [6] RZZA S, CATARA A, MAXE, et al. Detection of Multiple Infections of *Citrus Exocortis Viroid*, *Citrus Viroid III* and *Hop Stunt Viroid* Variants in Hunan Province, China [J]. *Plant Disease* 2007, 91 (9): 1205
- [7] YANG X, HADDIA, GARNSEY SM. Enzymatic CDNA Amplification of Citrus Exocortis and Cachexia Viroids from Infected Citrus Hosts [J]. *Phytopathology* 1992, 82: 279-285
- [8] BERNAD L, DURAN-VILA N. A novel RT-PCR Approach for Detection and Characterization of Citrus Viroids [J]. *Molecular and Cellular Probes* 2006 20: 105-113
- [9] 周常勇, HALLSTONES D, CONNOR R, 等. 一种微量、快速抽提柑桔衰退病毒 (CTV) 核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法 [J]. *福建农业大学学报*, 2001, 30 (增): 200
- [10] SANO T, HATAYA T, SHIKATA E. Complete Nucleotide Sequence of a Viroid Isolate from Etrog citron, a New Member of Hop Stunt Viroid Group [J]. *Nucleic Acids Research* 1988, 16: 347