

宁夏地区葡萄卷叶伴随病毒遗传变异的 PCR-SSCP 分析^①

李文学, 吕苗苗, 胡丽杰, 闫思远, 孙牧笛, 顾沛雯

宁夏大学 农学院, 银川 750021

摘要: 宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄卷叶病病株率较高, 严重影响了酿酒葡萄产业的健康发展, 但有关其病原葡萄卷叶伴随病毒(Grapevine leafroll-associated virus, GLRaVs)的遗传变异情况则鲜有报道. 利用 RT-PCR 技术对宁夏酿酒葡萄不同种植区的 7 个主栽品种的 GLRaV-1 和 GLRaV-3 进行分子检测, 利用 SSCP 技术对扩增片段进行遗传变异分析. 试验结果共获得 8 个 GLRaV-1 和 13 个 GLRaV-3 的阳性样本. 8 个 GLRaV-1 分离物基于 *CP* 基因分析差异明显, 可分为 3 类; 13 个 GLRaV-3 分离物基于 *RdRp* 基因分析差异明显, 可分为 3 类, 而基于 *CP* 和 *HSP70* 基因分析可分为 2 类. 说明宁夏酿酒葡萄不同种植区、不同品种的 GLRaV-1 和 GLRaV-3 种群分子特性存在差异且遗传变异明显. 这有助于宁夏地区酿酒葡萄 GLRaVs 流行病学调查和分子诊断分析, 为该病害的防控提供理论依据.

关键词: 葡萄卷叶伴随病毒; 遗传变异; RT-PCR 检测; SSCP; 宁夏贺兰山东麓

中图分类号: S432.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)10-0001-10

宁夏酿酒葡萄主栽区为贺兰山东麓的狭长地带, 其独特地理气候优势为酿酒葡萄生长提供了一个理想的环境, 但葡萄病毒病尤其是葡萄卷叶病危害严重, 降低了酿酒葡萄的产量和品质, 也影响了宁夏酿酒葡萄产业的发展. 与葡萄卷叶病相关的病原为葡萄卷叶伴随病毒(Grapevine leafroll-associated virus, GLRaVs), 目前已报道的 GLRaVs 至少有 5 种, 分别是 GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 (包括 GLRaV-4 的变种 GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-9, GLRaV-De, GLRaV-Pr 和 GLRaV-Car) 和 GLRaV-7^[1-3]. 在国内各葡萄产区, 感染葡萄卷叶病的葡萄园中 GLRaV-1 和 GLRaV-3 发生最为普遍, 报道也最多^[4-7].

2016 年, 吕苗苗等^[7]对宁夏各种植区的 8 个主栽酿酒葡萄品种田间自然发病情况进行了调查, 发现树龄 8 年以上的葡萄园 GLRaVs 的感染率均在 50% 以上, 个别品种如“蛇龙珠”和“黑比诺”的发病率高达 85.1% 和 52.7%. 2009 年, 顾沛雯^[8]通过对 *CP* 基因的克隆和序列比对, 研究 GLRaV-3 株系间的差异. 2018 年, 吕苗苗等^[9]通过 *CP*, *RdRp* 和 *HSP70* 基因检测宁夏酿酒葡萄 GLRaVs 种类, 检出率最高的为 GLRaV-1 和 GLRaV-3. 目前, 宁夏地区已报道的 GLRaVs 检出种类主要为 GLRaV-1, GLRaV-3 和 GLRaV-5^[7-10].

① 收稿日期: 2018-09-13

基金项目: 宁夏回族自治区“十三五”重大科技课题(2016BZ06); 国家自然科学基金项目(31460484).

作者简介: 李文学(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事植物病理学的研究.

通信作者: 顾沛雯, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师.

单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)技术是一种有效检测已知基因点突变或未知变异分析的方法^[11-12]。Turturo^[13]利用 SSCP 技术对 14 个国家的 GLRaV-3 的变异进行了综合分析,发现不同分离物间存在分子差异。目前,国内对 GLRaVs 的研究主要集中在检测技术的优化^[8, 14-16]和无毒苗木的培育^[17-19]等方面,而对 GLRaVs 的遗传变异研究较少。

本研究在已有研究基础上,对宁夏两个酿酒葡萄主产区的 15 份 GLRaVs 样本展开研究,以 GLRaV-1 和 GLRaV-3 分离物为研究对象,利用 SSCP 技术进行其遗传变异分析,初步揭示宁夏 GLRaV-1 和 GLRaV-3 种群的分子特性,本研究将有助于宁夏地区酿酒葡萄品种 GLRaVs 流行病学调查和分子诊断分析,为该病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料均采自宁夏银川和永宁地区,分别为银川地区志辉源石酒庄、新牛酒庄和广夏三基地;永宁地区立兰酒庄、新惠彬酒庄、玉泉营农垦东大滩和玉泉营农垦南大滩。酿酒葡萄品种为赤霞珠(*Cabernet Sauvignon*)、蛇龙珠(*Cabernet Gernischt*)、黑比诺(*Pinot Noir*)、霞多丽(*Chardonnay*)、品丽珠(*Cabernet Franc*)、西拉(*Shiraz*)和梅鹿辄(*Merlot*)。酿酒葡萄病株样品采集情况见表 1。

表 1 供试酿酒葡萄病株样本基本情况

序号	品种	采样点	种植年限/年	样本名称
1	赤霞珠(<i>Cabernet Sauvignon</i>)	立兰酒庄	4	LL-C
2	赤霞珠(<i>Cabernet Sauvignon</i>)	志辉源石酒庄	5	ZH-C
3	赤霞珠(<i>Cabernet Sauvignon</i>)	农垦东大滩	18	DDT-C
4	蛇龙珠(<i>Cabernet Gernischt</i>)	新牛酒庄	8	XN-S
5	蛇龙珠(<i>Cabernet Gernischt</i>)	新惠彬酒庄	20	XHB-S
6	蛇龙珠(<i>Cabernet Gernischt</i>)	农垦东大滩	18	DDT-S
7	黑比诺(<i>Pinot Noir</i>)	新惠彬酒庄	20	XHB-H
8	霞多丽(<i>Chardonnay</i>)	立兰酒庄	4	LL-X
9	品丽珠(<i>Cabernet Franc</i>)	广夏三基地	18	GX-P
10	品丽珠(<i>Cabernet Franc</i>)	新惠彬酒庄	20	XHB-P
11	西拉(<i>Shiraz</i>)	广夏三基地	18	GX-XL
12	梅鹿辄(<i>Merlot</i>)	农垦南大滩	7	NDT-M
13	梅鹿辄(<i>Merlot</i>)	广夏三基地	18	GX-M
14	赤霞珠(<i>Cabernet Gernischt</i>)	新惠彬酒庄	20	XHB-C
15	西拉(<i>Shiraz</i>)	新惠彬酒庄	20	XHB-XL

1.2 GLRaVs 的分子检测

1.2.1 引物序列

依据文献资料^[5, 20-21],登录 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)设计 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的特异性引物(表 2),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取方法

葡萄叶柄韧皮部组织 100 mg,加入液氮迅速研磨至粉末状,并迅速转移至 1.5 mL 离心管中,按照提取植物总 RNA 试剂盒(美国 OMEGA 公司)使用说明书进行总 RNA 的提取。

1.2.3 RT-PCR 检测

将提取的总 RNA,利用转录试剂盒(全式金公司)反转录成 cDNA,反应体系为 20 μ L:总 RNA 4 μ L,

OligDT18 Primer 1 μL , RNase-free Water 3 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 冰浴 2 min; 加入 2 $\times$ TSReaction Mix 10 μL , TransScriptTM RT 1 μL , gDNA Remover 1 μL , 轻轻混匀, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 s, 失活 TransScriptTM RT 和 gDNA Remover, 即得到所需的 cDNA.

利用 GLRaV-1 和 GLRaV-3 特异性引物对 15 个样品进行病毒检测. PCR 扩增反应体系为 25 μL : 总 cDNA 1.5 μL , 正、反向引物各 1 μL , Maxtaq 酶 12.5 μL , RNase-free Water 9 μL ; PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ . 用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 阳性样品 PCR 产物备用.

表 2 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的特异性引物序列

病毒	基因	引物	引物序列(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	扩增片段大小/bp	参考文献
GLRaV-1	CP	F1	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	52	232	Osman 等, 2006
		R1	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG			
GLRaV-3	CP	F	ATGGCATTGTGAAGTAAAAT	52	942	Ling 等, 2004
		R	CTACTTCTTTTGCAATAGT			
	RdRp	W4	CCATTTGTCCAGCAACAC	55	683	Ling 等, 1998
		W5	CCGACTAAATATAAGGCTATC			
	HSP70	F3	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	55	546	Osman 等, 2006
		R3	GTTGTCCCGGTACCAGATAT			

1.3 SSCP 分析

1.3.1 溶液配制

配制 30% 聚丙烯酰胺(交联度 29 : 1), 10% 过磷酸铵(APS)溶液, PCR-SSCP 变性缓冲液, 10 $\times$ TBE Buffer, 固定液, 0.2% 银染液和显色液.

1.3.2 SSCP 检测

按比例配制制备胶: 30% 聚丙烯酰胺 8 mL, 5 $\times$ TBE 6 mL, 10% APS 250 μL , TEMED 35 μL , ddH₂O 补足 30 mL, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冷 30 min. 阳性样品 PCR 产物 4 μL 加入至 6 μL 变性缓冲液中, 混合均匀后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性 10 min 后, 立即冰浴 5 min, 迅速上样, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 160 V 电泳 45 min.

1.3.3 银染过程

将胶板割下, 清水冲洗; 加入固定液固定 7 min, 清水轻轻冲掉固定液; 再用银染液银染 10 min, 清水冲洗; 后用显色液显色 7 min, 冲洗显色液后进行观察, 拍照保存.

1.4 聚类分析

非变性聚丙烯凝胶电泳(非变性 PAGE)中单链 DNA 空间构象的位阻实现不同条带的表达^[22]. GLRaV-1 和 GLRaV-3 阳性克隆 PCR 产物进行 SSCP 分析, 利用统计软件 SPSS 19.0 对各样品在非变性 PAGE 中的条带数和迁移长度进行数据处理并构建树状聚类.

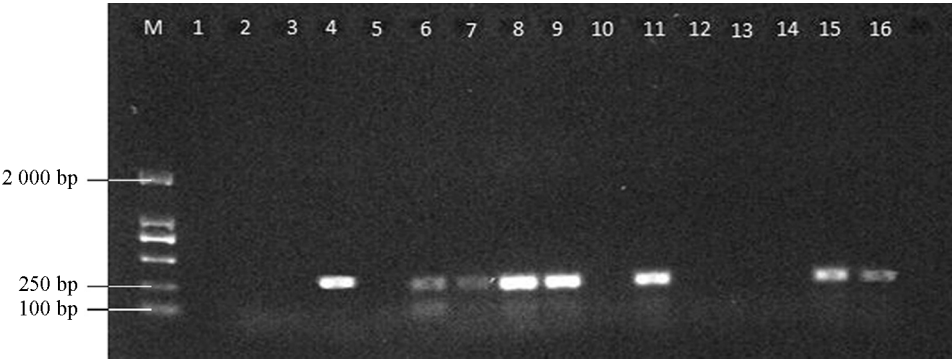
2 结果与分析

2.1 DNA 提取与质量检测

按照提取 RNA 试剂盒(美国 OMEGA 公司)使用说明书进行总 RNA 的提取, 所有提取的 RNA 样本凝胶电泳检测有两条清晰明亮带, 分别为 28S rRNA 和 18S rRNA; 其 OD 260/280 值介于 2.0~2.2 之间, 完整性和纯度较好, 满足 RT-PCR 要求.

2.2 GLRaV-1 CP 基因的 RT-PCR 检测

利用 GLRaV-1 CP 基因的序列特异性引物进行 RT-PCR 检测, 检出 8 个阳性样本在 230 bp 位置出现亮带(图 1), 与预期的 GLRaV-1 CP 基因序列大小相符.



M: Marker; 1: 清水对照; 2—16: 同表 1 顺序 1—15.

图 1 GLRaV-1 CP 基因的 RT-PCR 检测结果

2.3 GLRaV-3 CP, HSP70 和 RdRp 基因的 RT-PCR 检测

利用 GLRaV-3 CP, HSP70 和 RdRp 基因的序列特异性引物进行 RT-PCR 检测, 检出 13 个阳性样本分别在 940, 540 和 680 bp 位置出现亮带(图 2), 与预期的 GLRaV-3 CP, HSP70 和 RdRp 基因序列大小相符. 通过 GLRaV-3 的 CP, HSP70 和 RdRp 基因检测发现, 阳性样品的检测率一致.

2.4 GLRaV-1 和 GLRaV-3 PCR 产物的 SSCP 分析

2.4.1 GLRaV-1 CP 基因 PCR-SSCP 分析

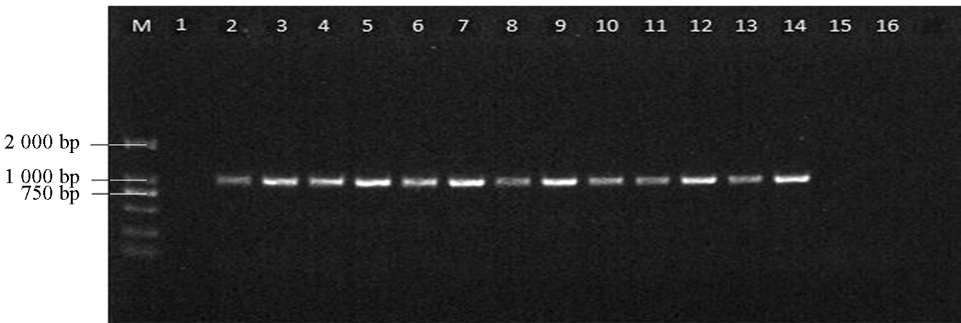
8 个 GLRaV-1 CP 基因的阳性样本 PCR 产物在非变性 PAGE 中, 实现了不同条带的表达. 结合样本在 SSCP 图谱(图 3a)中的迁移长度进行树状聚类分析(图 3b), 发现 8 个分离物之间有明显差异, 可归为 3 类: 分离物 XHB-P, XHB-S 和 XHB-XL 的相似性很高, 带数均为 4 条, 迁移长度为 1.7 cm, 归为 I a 类; XHB-C, DDT-S 和 DDT-C 的相似性很高, 带数均为 3 条, 迁移长度为 1.5 cm, 归为 I b 类; LL-X 和 XHB-H 的相似性很高, 带数均为 2 条, 迁移长度为 1.0 cm, 归为 I c 类. 8 个 GLRaV-1 分离物分布存在明显的地域性差异. 永宁地区酿酒葡萄品种蛇龙珠得到的分离物 XHB-S 和 DDT-S 分别归为 I a 和 I c 类; 而酿酒葡萄品种蛇龙珠和品丽珠的分离物 XHB-S 和 XHB-P 则归为 I b 类, 从黑比诺和霞多丽得到的分离物 XHB-H 和 LL-X 则归为 I c 类.

2.4.2 GLRaV-3 CP 基因 PCR-SSCP 分析

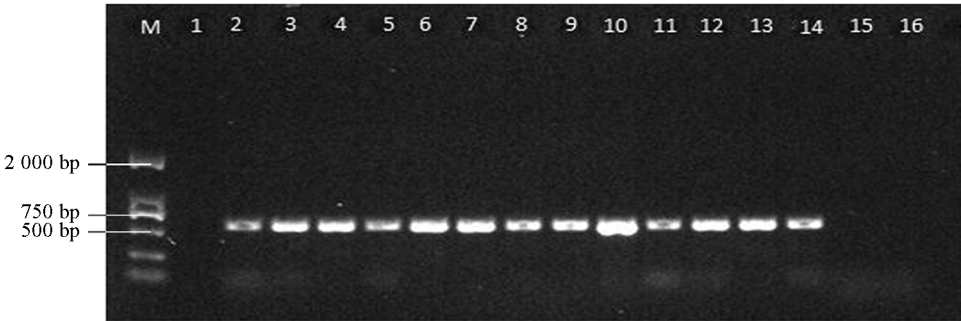
13 个 GLRaV-3 CP 基因的阳性样本 PCR 产物进行 SSCP 分析, GLRaV-3 CP 基因的 SSCP 图谱表现为 2 种带型(图 4a), 结合在图谱中迁移的长度进行树状聚类分析(图 4b), 发现 13 个分离物之间有明显差异, 可归为 2 类: GLRaV-3 CP 基因分离物 LL-C, ZH-C, XN-S, DDT-S, LL-X, GX-P, XHB-P, GX-XL, NDT-M 和 GX-M 的相似性较高, 带数为 1 条, 迁移长度为 2.3 cm, 归为 II a 类; 分离物 DDT-C, XHB-S 和 XHB-H 的相似性较高, 带数为 2 条, 迁移长度为 1.8 cm, 归为 II b 类.

2.4.3 GLRaV-3 HSP70 基因 PCR 产物的 SSCP 分析

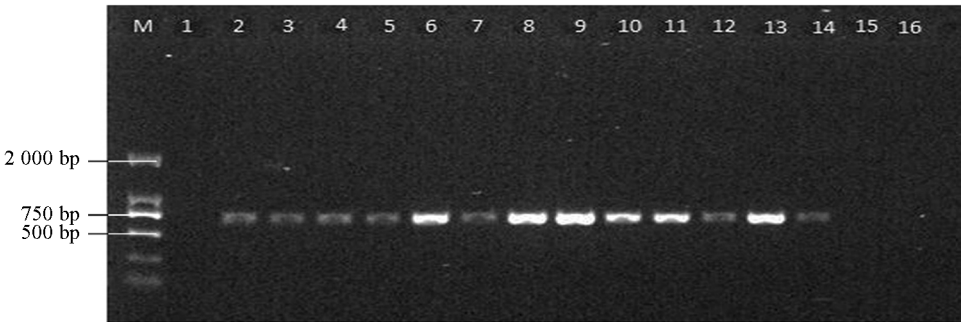
对 13 个 GLRaV-3 HSP70 基因阳性样本 PCR 产物进行 SSCP 分析, GLRaV-3 HSP70 基因的扩增产物图谱也表现为 2 种带型(图 5a), 结合在图谱中迁移的长度进行树状聚类分析(图 5b), 发现 13 个分离物之间有明显差异, 可归为 2 类: GLRaV-3 HSP70 基因分离物 LL-C, ZH-C, XN-S, DDT-S, XHB-H, GX-P, XHB-P, GX-XL 和 GX-M 的相似性较高, 带数为 1 条, 迁移长度为 2.3 cm, 归为 III a 类; 分离物 DDT-C, XHB-S, LL-X 和 NDT-M 的相似性较高, 带数为 2 条, 迁移长度为 1.8 cm, 归为 III b 类. 分离物 XHB-H, LL-X 和 NDT-M 的聚类结果与 GLRaV-3 CP 基因的聚类结果不一致, 可能存在碱基变异.



(a) *CP* 基因



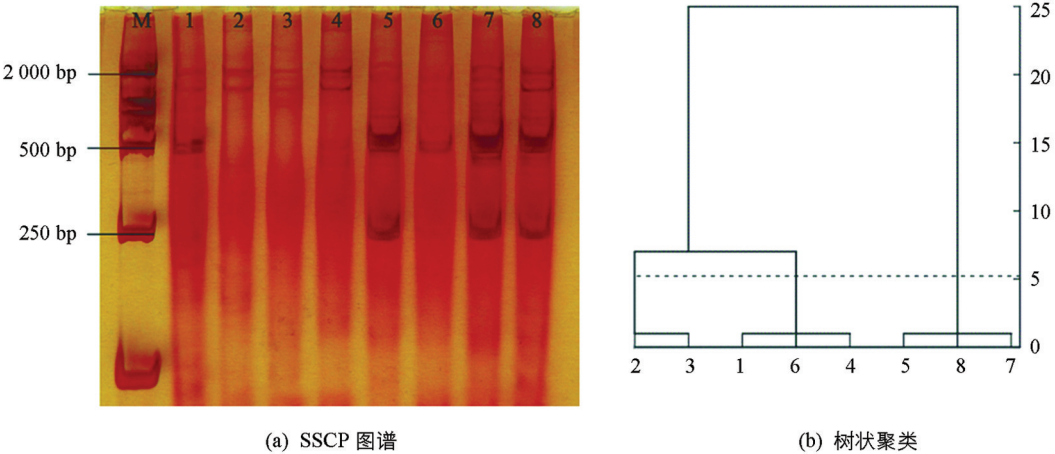
(b) *HSP70* 基因



(c) *RdRp* 基因

M: Marker; 1: 清水对照; 2—16: 同表 1 顺序 1—15.

图 2 GLRaV-3 *CP*, *HSP70* 和 *RdRp* 基因的 RT-PCR 检测结果

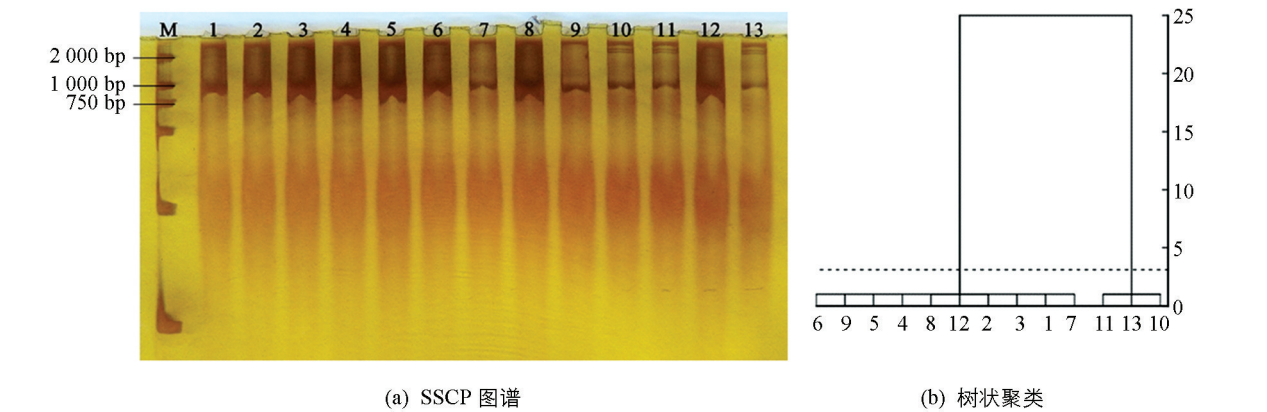


(a) SSCP 图谱

(b) 树状聚类

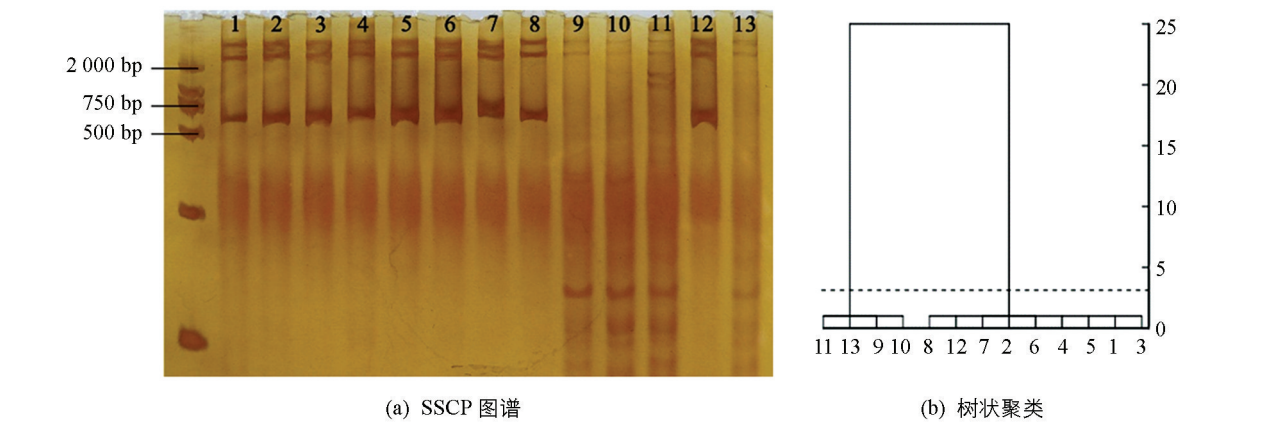
M: Marker; 1: DDT-C; 2: LL-X; 3: XHB-H; 4: XHB-C; 5: XHB-P; 6: DDT-S; 7: XHB-S; 8: XHB-XL.

图 3 GLRaV-1 *CP* 基因 PCR 扩增产物的 SSCP 图谱及树状聚类



M: Marker; 1: LL-C; 2: ZH-C; 3: DDT-S; 4: GX-P; 5: XHB-P; 6: GX-M; 7: GX-XL; 8: XN-S; 9: LL-X; 10: DDT-C; 11: XHB-H; 12: NDT-M; 13: XHB-S.

图 4 GLRaV-3 CP 基因 PCR 扩增产物的 SSCP 图谱及树状聚类



M: Marker; 1: LL-C; 2: ZH-C; 3: DDT-S; 4: GX-P; 5: XHB-P; 6: GX-M; 7: GX-XL; 8: XN-S; 9: LL-X; 10: DDT-C; 11: NDT-M; 12: XHB-H; 13: XHB-S.

图 5 GLRaV-3 HSP70 基因 PCR 扩增产物的 SSCP 图谱及树状聚类

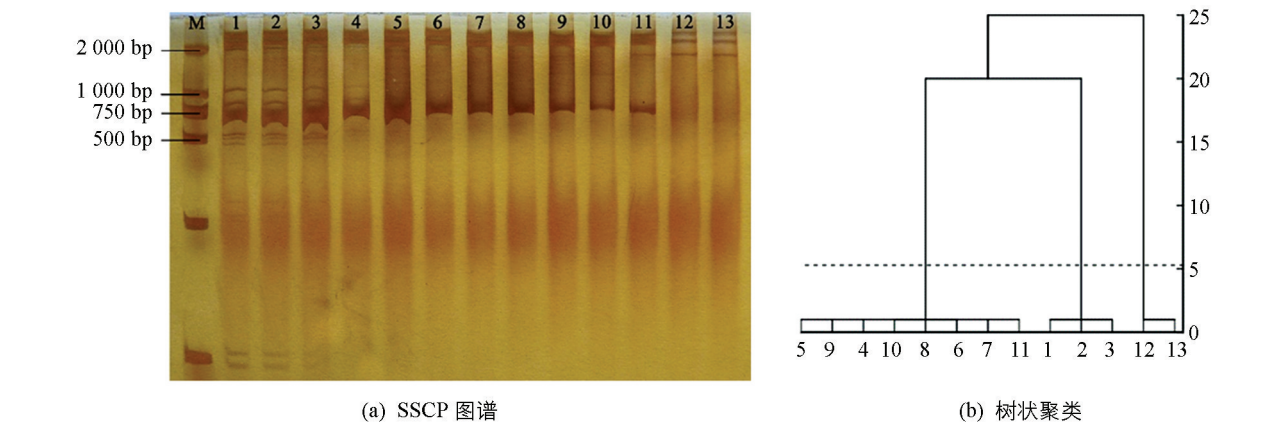
2.4.4 GLRaV-3 RdRp 基因 PCR-SSCP 分析

对 13 个 GLRaV-3 *RdRp* 基因阳性样本 PCR 产物进行 SSCP 分析，而 GLRaV-3 *RdRp* 基因的扩增产物图谱表现为 3 种带型(图 6a)，结合在图谱中迁移的长度进行树状聚类分析(图 6b)，发现 13 个分离物之间有明显差异，可归为 3 类：GLRaV-3 *RdRp* 基因分离物 ZH-C,XN-S,DDT-S,LL-X,GX-P,XHB-P,GX-XL 和 GX-M 的相似性较高，带数为 2 条，迁移长度为 2.5 cm，归为Ⅳa 类；分离物 LL-C,DDT-C 和 NDT-M 的相似性较高，带数为 3 条，迁移长度为 1.5 cm，归为Ⅳb 类；分离物 XHB-S 和 XHB-H 的相似性较高，带数为 2 条，迁移长度为 0.9 cm，归为Ⅳc 类。

2.5 宁夏地区不同品种间 GLRaV-1 和 GLRaV-3 种群差异

由表 3 可知，应用 PT-PCR 和 SSCP 技术分析 GLRaVs 的遗传变异，对不同区域、不同品种分离得到的 GLRaV-1 和 GLRaV-3 种群遗传变异比较发现，同一地区不同品种、同一品种不同地区分离物检出 GLRaV-1 和 GLRaV-3 结果差异较大。阳性分离物 DDT-C,XHB-S,DDT-S,XHB-P,XHB-H 和 LL-X 均存在 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的复合侵染现象，聚类分析结果也不相同，相互之间变异较大；永宁地区新惠彬酒庄葡萄园 5 大酿酒葡萄品种均检出 GLRaVs，但检出结果不同；广夏三基地葡萄园 3 大酿酒葡萄品种均只检出 GLRaV-3。从宁夏地区获得的 13 个 GLRaV-3 分离物之间存在着明显的地域分布性差异，且不同品种

间也存在差异。永宁地区酿酒葡萄品种蛇龙珠 GLRaV-3 *CP*, *HSP70* 和 *RdRp* 基因的阳性分离物 XHB-S 和 DDT-S 分别归为 II b, III b, IV c 类和 II a, III a, IV a 类, 且 DDT-S 与银川新牛酒庄葡萄园阳性分离物 XN-S 的 GLRaV-3 检测结果一致, 但 XN-S 未检测到 GLRaV-1。永宁地区酿酒葡萄品种霞多丽的阳性分离物 LL-X 和品丽珠的阳性分离物 XHB-P 将 GLRaV-3 归为 II a, III a, IV a 类, 同一地区的不同品种间 GLRaV-3 变异程度具有相似性。酿酒品种赤霞珠阳性分离物 LL-C 和 ZH-C 只检出 GLRaV-3, XHB-C 只检出 GLRaV-1, 而 DDT-C 存在复合侵染; 检出 GLRaV-1 的聚类分析结果一致, 但检出 GLRaV-3 的阳性分离物 LL-C, ZH-C 和 DDT-C 聚类分析结果差异较大, 同一品种不同地区 GLRaV-1 和 GLRaV-3 的侵染结果不同, 且变异较大。



M: Marker; 1: LL-C; 2: DDT-C; 3: NDT-M; 4: GX-P; 5: XHB-P; 6: GX-M; 7: GX-XL; 8: XN-S; 9: LL-X; 10: ZH-C; 11: DDT-S; 12: XHB-H; 13: XHB-S.

图 6 GLRaV-3 *RdRp* 基因 PCR 扩增产物的 SSCP 图谱及树状聚类

表 3 供试样本 GLRaV-1 和 GLRaV-3 检出和归类

样本名称	GLRaVs 检出及归类			
	GLRaV-1 <i>CP</i>	GLRaV-3 <i>CP</i>	GLRaV-3 <i>HSP70</i>	GLRaV-3 <i>RdRp</i>
LL-C		+ II a	+ III a	+ IV b
ZH-C		+ II a	+ III a	+ IV a
DDT-C	+ I b	+ II b	+ III b	+ IV b
XHB-C	+ I b			
XN-S		+ II a	+ III a	+ IV a
XHB-S	+ I a	+ II b	+ III b	+ IV c
DDT-S	+ I b	+ II a	+ III a	+ IV a
GX-P		+ II a	+ III a	+ IV a
XHB-P	+ I a	+ II a	+ III a	+ IV a
NDT-M		+ II a	+ III b	+ IV b
GX-M		+ II a	+ III a	+ IV a
GX-XL		+ II a	+ III a	+ IV a
XHB-XL	+ I a			
XHB-H	+ I c	+ II b	+ III a	+ IV c
LL-X	+ I c	+ II a	+ III b	+ IV a

注：“+”表示检出该 GLRaVs 病毒。

3 讨 论

宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄产业发展早期,在葡萄病毒检测体系极不完善的情况下从美国、法国、河北昌黎和山东烟台等地引种栽培,在这种粗放式管理和大面积推广种植下,葡萄病毒得以快速在产区传播蔓延^[23-24]。1999年,宁夏玉泉营地区葡萄圃中26%的品种表现卷叶病症状,酿酒葡萄品种田间发病率为31.37%^[25];2006-2009年,沙月霞等^[10]的调查结果显示葡萄卷叶病发病率为36.0%;2016年,宁夏产区树龄8年以上的果园中主栽酿酒葡萄品种“蛇龙珠”和“黑比诺”田间自然发生葡萄卷叶病的发病率高达85.1%和52.7%^[7]。近年来,宁夏开展酿酒葡萄卷叶伴随病毒检测和无病毒苗木的培育工作时,主要检测出的3种病毒类型中GLRaV-1和GLRaV-3的检出率最高,GLRaV-3的研究最为广泛,同时存在GLRaVs的复合侵染现象^[7, 9-10]。葡萄卷叶伴随病毒病,属于RNA病害,由于RNA病毒复制快且缺乏校正机制,碱基错配重组极易发生^[26],表现出高度变异。2002年,刘命华等^[27]对GLRaV-1 CP基因序列进行分析,发现其核苷酸和氨基酸同源性相对较低,暗示GLRaV-1分离物可能具有较高的遗传变异。2011年,Alabi等^[28]对美国34个GLRaV-1分离物的4个基因(CP, HSP70, CPd2和P24)进行多样性分析,发现GLRaV-1 CP基因的变异性较高。本研究结果表明,8个GLRaV-1 CP基因分离物有3种类型,表现出较高的变异性,这与上述研究结果基本一致。一些学者对获得的GLRaV-3分离物CP基因进行序列比对分析和多样性分析,结果显示CP基因是GLRaV-3基因重组较活跃的区域,可能存在着基因变异,不同分离物间的基因重组形成了新的变异种^[29-30]。Turturo等^[13]利用SSCP技术对45个葡萄样品GLRaV-3 CP, HSP70和RdRp基因的变异研究发现,上述基因存在多种不同类型的变异型,且GLRaV-3 CP基因的变异几率较大,而HSP70基因的变异几率较小, RdRp基因若发生变异定会引起GLRaV-3分子结构的变化。本研究结果显示,13个GLRaV-3 CP, HSP70和RdRp基因分离物分别有多种不同类型,与上述研究结果相类似,可能由于宁夏地区早期大面积推广苗木自繁、嫁接等措施导致病毒的复合侵染,增加了基因重组的几率,致使出现多种变异类型。但宁夏GLRaV-3分离物表现的不同类型是否由基因重组导致,还需要进一步检测。

4 结 论

利用RT-PCR技术对宁夏酿酒葡萄不同种植区的7个主栽品种的GLRaV-1和GLRaV-3进行分子检测,试验结果共获得8个GLRaV-1和13个GLRaV-3的阳性样本。说明GLRaV-1和GLRaV-3在宁夏不同种植区的酿酒葡萄品种间都有不同程度的侵染,且存在复合侵染。利用SSCP技术对扩增片段进行遗传变异分析,表明各分离物之间存在着明显的遗传变异。8个GLRaV-1分离物基于CP基因分析差异明显,可分为3类;13个GLRaV-3分离物基于RdRp基因分析差异明显,可分为3类,而基于CP和HSP70基因分析可分为2类。说明宁夏酿酒葡萄不同种植区、不同品种的GLRaV-1和GLRaV-3种群分子特性存在差异且遗传变异明显。分离物的遗传变异不仅表现在种植区的分布上,同时也表现在不同品种间。

参考文献:

- [1] AL RWAHNIH M, DOLJA V V, DAUBERT S, et al. Genomic and Biological Analysis of Grapevine Leafroll-Associated Virus 7 Reveals a Possible New Genus within the Family *Closteroviridae* [J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 302-309.
- [2] MARTELLI G P, ABOU GHANEM-SABANADZOVIC N, AGRANOVSKY A A, et al. Taxonomic Revision of the Family *Closteroviridae* with Special Reference to the Grapevine Leafroll-associated Members of the Genus *Ampelovirus* and the Putative Species Unassigned to the Family [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2012, 94(1): 7-19.
- [3] NAIDU R A, MAREE H J, BURGER J T. Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem

[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53(1): 613-634.

[4] FAZELI C F, REZAIAN M A. Nucleotide Sequence and Organization of Ten Open Reading Frames in the Genome of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 and Identification of Three Subgenomic RNAs [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(3): 605-615.

[5] LING K S. 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.

[6] 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, 549.

[7] 吕苗苗, 纳莹, 孙牧笛, 等. 宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄病毒病田间自然发病率调查及检测 [J]. *北方园艺*, 2017(13): 55-62.

[8] 顾沛雯. 葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ宁夏分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. *宁夏大学学报(自然科学版)*, 2009, 30(4): 383-386.

[9] 吕苗苗, 李文学, 孙牧笛, 等. 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 [J]. *植物保护*, 2018, 44(1): 74-80.

[10] 沙月霞, 王国珍, 樊仲庆, 等. 贺兰山东麓葡萄品种卷叶病毒(GLRaV-3)携带状况研究 [J]. *宁夏农林科技*, 2009, 50(6): 15-16, 9.

[11] 姜运良, 李宁, 赵兴波, 等. 影响 PCR-SSCP 的因素分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 245-247.

[12] 周彦, 王雪峰, 唐科志, 等. 重庆地区柑桔衰退病毒组群分析 [J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 26(4): 420-422, 451.

[13] TURTURO C. Genetic Variability and Population Structure of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 Isolates [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(1): 217-224.

[14] 陈建军, 刘崇怀, 古勤生, 等. DAS-ELISA、RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测葡萄卷叶病毒Ⅲ的比较研究 [J]. *果树学报*, 2003, 20(3): 173-177.

[15] 牛建新, 陈萍, 马兵钢. 葡萄病毒病多重 RT-PCR 检测技术体系优化分析 [J]. *果树学报*, 2004, 21(2): 120-123.

[16] 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.

[17] 袁彬, 潘学军. 毛葡萄原生质体分离与纯化研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(12): 97-101.

[18] 郭西智, 顾红, 陈锦永, 等. 葡萄脱毒及无毒苗木快速繁育技术 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2016(1): 27-30.

[19] HAO X Y, BI W L, CUI Z H, et al. Development, Histological Observations and Grapevine Leafroll-Associated Virus-3 Localisation in in Vitro Grapevine Micrografts [J]. *Annals of Applied Biology*, 2017, 170(3): 379-390.

[20] 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.

[21] LING S, SLIGHTOM L, GONSALVES D, 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.

[22] 林含新, 魏太云, 吴祖建, 等. 应用 PCR-SSCP 技术快速检测我国水稻条纹病毒的分子变异 [J]. *中国病毒学*, 2001, 16(2): 166-169.

[23] 牛锐敏, 陈卫平, 王国珍, 等. 几个酿酒葡萄品种在广夏第三种植基地的栽培表现 [J]. *北方园艺*, 2012(10): 9-12.

[24] 李玉鼎, 刘廷俊, 赵世华. 宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄建园的基本经验及成龄园改造技术 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2006(2): 18-20.

[25] 顾沛雯, 洪波, 马永明, 等. 宁夏玉泉营地区葡萄卷叶病田间自然发病调查及检测 [J]. *宁夏农学院学报*, 2001, 22(3): 21-23, 38.

[26] 周艳, 郑海红, 袁世山. RNA 病毒的重组机制及其研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(6): 71-76.

[27] 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.

- [28] ALABI O J, AL RWAHNIH M, KARTHIKEYAN G, et al. Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 Occurs as Genetically Diverse Populations [J]. *Phytopathology*, 2011, 101(12): 1446-1456.
- [29] 徐章逸, 王国平, 刘亚萍, 等. 葡萄卷叶伴随病毒-3 外壳蛋白的原核表达及其特异性抗血清的制备 [J]. *植物病理学报*, 2010, 40(2): 129-134.
- [30] FAROOQ A B U, MA Y X, WANG Z Q, 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.

PCR-SSCP Analysis of Genetic Variation Among GLRaVs in Ningxia

LI Wen-xue, LÜ Miao-miao, HU Li-jie,
YAN Si-yuan, SUN Mu-di, GU Pei-wen

Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: The rate of diseased plants of grapevine leaf roll disease is relatively high in the eastern Helan mountain region of Ningxia, which seriously hinders the healthy development of the wine grape industry, but the genetic variation of grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs), i. e. the pathogen of this disease, is poorly understood. In an experiment reported in this paper, PT-PCR technique was used to detect GLRaV-1 and GLRaV-3 of 7 widely cultivated wine grape cultivars in different growing regions of Ningxia, and the SSCP technology was employed to analyze the genetic variation of the amplified fragments. A total of 8 positive samples of GLRaV-1 and 13 positive samples of GLRaV-3 were obtained in the test. Based on the *CP* gene analysis, the 8 GLRaV-1 isolates showed significant differences, which were divided into 3 categories. The 13 GLRaV-3 isolates also showed significant differences, and they were divided into 3 categories based on *RdRp* gene analysis and into 2 categories based on *CP* and *HSP70* gene analyses. The above results showed that there were significant differences and genetic variations in the population molecular characteristics of GLRaV-1 and GLRaV-3 which originated from different wine grape cultivars and from different grape-growing areas in Ningxia.

Key words: grapevine leafroll-associated virus (GLRaVs); genetic variation; RT-PCR detection; single-strand conformation polymorphism (SSCP); the Helan mountain region of Ningxia

责任编辑 周仁惠