园 艺 学 报 2008, 35 (6): 805 - 810
Acta Horticulturae Sinica

新疆杏树苹果锈果类病毒的检测与全序列分析

赵 英, 牛建新*
(石河子大学农学院园艺系, 新疆石河子 832003)

摘 要: 在以往研究苹果锈果类病毒 (ASSVd) 的基础上, 以斑点杂交检测 ASSVd呈阳性的杏树为试验材料, 利用 RT-PCR技术扩增出苹果锈果类病毒全长特异片段, 通过回收克隆测序, 发现杏树苹果锈果类病毒基因组长为 330 nt, 将克隆测序结果在 GenBank中登录, 获得 10条序列, 登录号为 EU031487～EU031496。在此基础上, 利用原位 RT-PCR检测技术, 进一步证明杏树叶片中有苹果锈果类病毒存在, 主要分布在细胞核中。本研究证实苹果锈果类病毒也能侵染杏树。

关键词: 杏树; 病毒; 苹果锈果类病毒; 斑点杂交; RT-PCR; 原位 RT-PCR; 全序列分析
中图分类号: S 662.2　**文献标识码**: A　**文章编号**: 0513-353X (2008) 06-0805-06

Detection and Sequencing of *Apple scar skin viroid* from Apricot in Xinjiang

ZHAO Ying and NIU Jian-xin*
(*Department of Horticulture, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang* 832003, *China*)

Abstract: Present study was conducted based on the previous research of *Apple scar skin viroid* (ASSVd) for apple and pear, used material of apricot was those that showed positive signal of blot hybridization detection. Full-length special fragment of ASSVd for apricot was amplicated using RT-PCR protocol, then was recycled, cloned and sequenced. It was demonstrated that the full-length genome of ASSVd of apricot is 330 nt long (GenBank numbered with EU031487 to EU031496). The exist of ASSVd in apricots was reconfirmed by the results of *in situ* RT-PCR, and ASSVd mainly located in nucleolus of mesophyll cell. The fact of infecting capability of apricot enlarged the host ranges of ASSVd.

Key words: apricot; virus; *Apple scar skin viroid*; blot hybridization; RT-PCR; *in situ* RT-PCR; full length analysis

类病毒是迄今为止发现的最小病原物, 是一类单链共价闭合环状的裸露 RNA分子, 由 246～574个核苷酸组成, 根据序列和结构的同源性、复制特性分为两个科, 分别为马铃薯纺锤块茎类病毒科 (Pospiviroidae) 和鳄梨日斑类病毒科 (Avsunviroidae)。

苹果锈果类病毒 (*Apple scar skin viroid*, ASSVd) 属于 Pospiviroidae科, 通常含 330个左右核苷酸, 存在细胞核内, 有中央保守序列且不具有核酶活性, 非对称滚式复制。日本学者 Hashimoto和 Koganezawa (1987) 首次报道了 ASSVd全序列, 确认其为类病毒。据报道 (Hadidi et al, 1991; Yang et al, 1992) ASSVd可侵染苹果和梨树, 国内学者 (郭瑞 等, 2005; 赵英和牛建新, 2006) 分别克隆分析了苹果锈果类病毒的序列。但关于 ASSVd侵染杏树尚未见报道。

本研究利用 RT-PCR、斑点杂交和原位 RT-PCR技术, 首次发现并证实新疆杏树上有 ASSVd存在, 克隆其全长, 并在 GenBank中登录。

收稿日期: 2008 - 03 - 07; **修回日期**: 2008 - 05 - 13
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30360066); 国家科技攻关计划引导项目 (2003BA546C); 兵团科委项目 (NKB02SDXNK01SW)
* **通讯作者** Author for correspondence (E-mail: njx105@163.com)

1 材料与方法

1.1 材料

采集新疆焉耆地区多种果树（苹果、梨、桃、杏）混生的老果园中的杏树幼嫩叶片和枝条，提取总 RNA。其中编号为 AP1～AP10的样品通过斑点杂交检测带有 ASSVd。

1.2 引物

根据 NCBI网站中发表的 NC_001340序列设计 ASSVd引物。ASSVd$_1$：5′-CAGCACCACAGGAACCTCACGG-3′(互补引物 22 bp)、ASSVd$_2$：5′-CTCGTCGTCGACGAAGG-3′(同源引物 17 bp)。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA提取

参考赵英和牛建新（2006）的方法进行。

1.3.2 RT-PCR

反转录体系：25 μL体系中总 RNA 10 μL、DEPC水 5 μL、互补引物 ASSVd$_1$ 1 μL（20 μmol · L^{-1}）。100 ℃变性 5 min，冰浴 5 min，加入 5 ×Buffer（Mg^{2+} 40 mmol · L^{-1}）5 μL、dNTPs 2.0 μL、RNasin 0.5 μL，42 ℃预热 5 min，加 M-MLV 1 μL。反应程序：42 ℃温育 1 h，100 ℃灭活 4 min，立即置于冰上，-20 ℃保存待用。

PCR体系：10 ×Buffer 2.0 μL、dNTPs（each 10 mmol · L^{-1}）0.5 μL、Mg^{2+} 1.6 μL（25 mmol · L^{-1}）、引物 ASSVd$_1$和 ASSVd$_2$各 1 μL（20 μmol · L^{-1}）、cDNA 3 μL、*Taq*E 0.5 μL（5 U · μL^{-1}），总体积 20 μL。反应程序：95 ℃预变性 3 min，32个循环：95 ℃ 30 s，62 ℃ 45 s，72 ℃ 60 s，最后 72 ℃延伸 7 min。取出，95 ℃以上灭活 4 min。

2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，电泳缓冲液用 1 ×TBE，电压 120 V，电泳 40 min，北京市六一仪器厂生产的 Gold View荧光染料显色，以华美产 PCR Marker为核酸长度对照。

1.3.3 克隆及测序

用 2%琼脂糖凝胶回收，1 ×TAE缓冲体系进行电泳分离，染色后，长波紫外灯下切取目的片段，用 UNIQ-10 Gel Extraction Kit（Sangon产品）回收 DNA片段。操作均按照产品的使用说明进行。

克隆载体采用上海生工生物工程技术服务有限公司的 pUCm-T Vector System，长 2 773 bp，具有 Amp的抗性，可用于蓝白斑筛选。参照 pUCm-T载体克隆试剂盒操作说明，用上述纯化后的目的片段和 pUCM-T克隆载体连接，然后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，通过酶切和 PCR鉴定阳性克隆。

测序工作委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行，序列结果采用 www.ncbi.nlh.gov网站中 BLAST和 DNAMAN软件进行序列分析。

1.3.4 cDNA探针检测

探针合成和检测参考赵英和牛建新（2007）的方法。

1.3.5 石蜡切片制作与原位 RT-PCR检测预处理

参见牛建新等（2007）的方法。

1.3.6 cDNA的合成

在 0.2 mL Eppendorf管中加入 SuperScript Ⅱ RT预混液［DEPC H_2O 9 μL、5 ×Frist-Strand Buffer（$MgCl_2$ 15 mmol · L^{-1}）4 μL、dNTPs（each 10 mmol · L^{-1}）2 μL、RNasin（40 U · μL^{-1}）1 μL、Antisense Primer（20 μmol · L^{-1}）1 μL、DDT（0.1 mol · L^{-1}）2 μL、SuperScript Ⅱ RT（200 U · μL^{-1}）

1 μL］20 μL。将该混合液加于切片上，切片放于湿盒，密封 42 ℃温育 1 h。95 ℃灭活 2 min；用双蒸水冲洗切片 10 min，室温干燥。

1.3.7　原位 PCR扩增

在 0.2 mL Eppendorf管中按顺序加入以下试剂：ddH_2O 12 μL、10 ×LA PCR Buffer（Mg^{2+} free）2.5 μL、dNTP（10 mmol・μL^{-1}）0.5 μL、引物 P1（20 pmol・μL^{-1}）1 μL、引物 P2（20 pmol・μL^{-1}）1 μL、Dig-11-dUTP（1 nmol・μL^{-1}）2.5 μL、LA *Taq* DNA多聚酶（5 U・μL^{-1}）0.5 μL，总体积 20 μL。混匀，加到贴有基因框的切片上，用配套盖膜封好，放入 PCR仪扩增。ASSVd扩增程序：95 ℃预变性 3 min，32个循环：95 ℃ 1 min，62 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，最后 1个循环延伸 10 min。变性 5 min。

去掉基因框用洗液 2 ×SSC洗载玻片两次，各 20 min。

1.3.8　原位 PCR产物的免疫检测

切片加 100 μL封闭液（100 mmol・L^{-1} Tris-HCl，pH 7.5；150 mmol・L^{-1}NaCl；3%BSA），放于湿盒 37 ℃ 30 min，用吸水纸放在载玻片的边缘，吸去玻片上的封闭液。切片加 100 μL碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体（在新鲜封闭液中以 1∶100稀释），湿盒室温下放置 30 min。将玻片浸泡于清洗液中（100 mmol・L^{-1} Tris-HCl，pH 7.5；150 mmol・L^{-1}NaCl），室温洗 2次，每次 15 min。将玻片浸泡于清洗液中（100 mmol・L^{-1} Tris-HCl，pH 7.5；150 mmol・L^{-1}NaCl，50 mmol・$L^{-1}$$MgCl_2$），室温洗 5 min。

加 100 μL NBT/BCIP液，静置 60 min显色。组织形成不溶性蓝黑色的地方就是扩增的位置。用 TE清洗切片 10 min终止显色。用常规技术脱水并用中性树胶封片。

显微镜下观察并照相。阳性信号为蓝黑色。

试验中除了无类病毒苗（通过 RT-PCR和探针杂交检测不带苹果锈果类病毒）作为阴性对照外，还以 PCR中省去引物、省去 DNA聚合 *Taq*酶、省略 RT步骤及省去 Mg^{2+}作为阴性对照。

2　结果与分析

2.1　总 RNA检测与 RT-PCR扩增结果

结果表明，本试验所提取的总 RNA完整性较好（图 1），可用于 RT-PCR扩增。

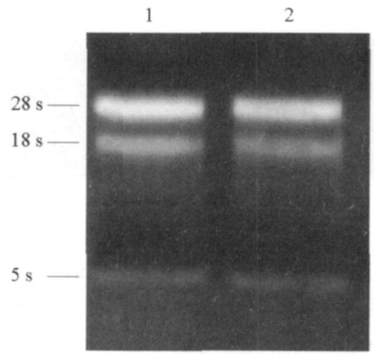

图 1　杏组织总 RNA

1：韧皮部 RNA；2：叶片 RNA。

Fig. 1　Total RNA of apricot

1：The total RNA isolated from phloem of apricot;

2：The total RNA isolated from leaf of apricot

利用 ASSVd类病毒引物进行 RT-PCR扩增，获得了 330 bp左右大小的预期目的片段 (图 2)。

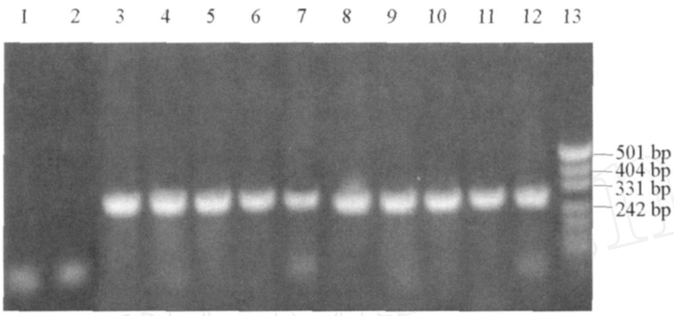

图 2 杏 ASSVd RT-PCR检测结果

1: 阴性对照; 2: 单引物对照; 3～12: 杏样品 AP1～AP10; 13: Marker。

Fig. 2 The RT-PCR products of ASSVd in total RNA of apricot

1: The negative control; 2: Control of a single primer;

3 - 12: Apricot sample AP1 - AP10; 13: Marker.

2.2 杏树苹果锈果类病毒 RT-PCR产物克隆和序列分析

克隆测序结果表明，杏树苹果锈果类病毒全长为 330 nt。

通过 BLAST对比分析发现，该杏树苹果锈果类病毒与苹果锈果类病毒同源性很高，与 GenBank中登录的序列 AJ783357、Y00435、AF421195、X17696、DQ362907、AY972082、DQ362906的同源性也均在 93%以上。将获得的 10条全长序列在 GenBank上登录，登录号为: EU031487～EU031496，这 10条序列相互之间的同源性均在 98%以上，因此可以确认，通过 RT-PCR扩增出的特异片段为苹果锈果类病毒序列。

这在国内外尚属首次发现，证实了苹果锈果类病毒也能侵染杏树。

2.3 斑点杂交检测结果

将 RNA样品经过变性处理后，用稀释液 (DEPC处理水∶20 ×SSC∶甲醛 =5∶3∶2) 依次进行 10^{-1}和 10^{-2}稀释后，分别取 1 μL，点样在硝酸纤维素膜上，用标记探针与之进行杂交。结果 (图 3) 表明，杏树组织总 RNA稀释 10^{-2}后仍能清楚地检测到苹果锈果类病毒的存在。

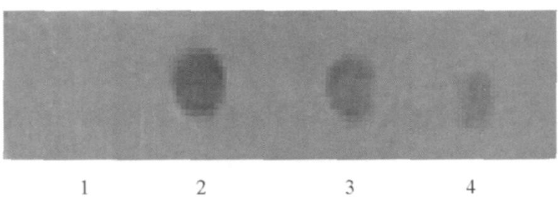

图 3 杏树 ASSVd斑点杂交检测

1. 对照 (无锈果类病毒的核酸); 2. 未稀释; 3. 稀释 10^{-1}; 4. 稀释 10^{-2}。

Fig. 3 Detection of ASSVd by dot blot hybridization

1. Negative control; 2. Undiluted; 3. Dilution at 10^{-1}; 4. Dilution at 10^{-2}.

2.4 苹果锈果类病毒在杏树叶片组织中的分布

设置 5种对照，在经充分洗涤后对照切片均未出现蓝黑色，而阳性材料在栅栏组织中的一些细胞核中出现了蓝黑色。这表明，苹果锈果类病毒主要位于叶肉细胞核中 (图 4)。

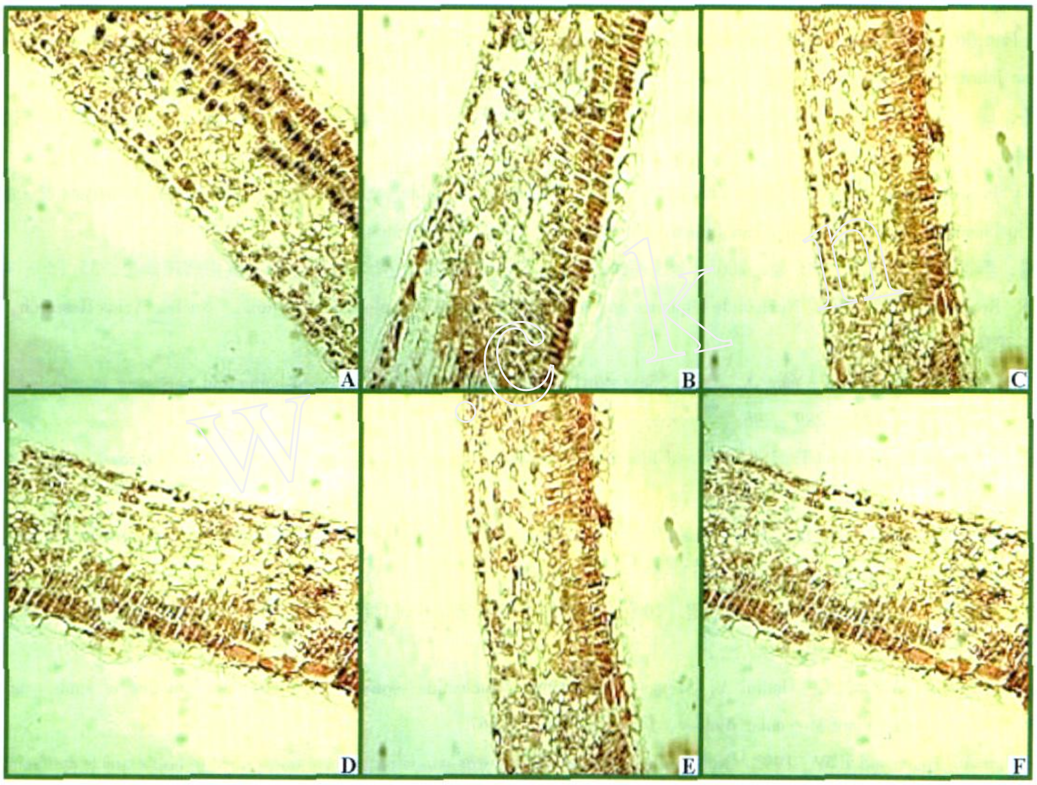

图 4 苹果锈果类病毒在叶片组织中的分布

A：阳性材料；B～F：对照（B：PCR中省去 *Taq*酶；C：PCR中省去逆转录步骤；D：PCR中省去引物；E：健康杏材料；F：PCR中省去 Mg^{2+}）。

Fig. 4 Location of ASSVd in leaf tissues paraffin slice detected by in situ **RT-PCR**

A：Display distinct staining；B - F：Control（B：Negative control with *Taq* DNA polymerase omitted；C：Negative control with reverse transcription step omitted；D：Negative control with primers omitted；E：Known negative sample；F：Negative control with Mg^{2+} omitted）.

3 讨论

Koganezawa（1983）首次报道在苹果锈果病果中检出类病毒 RNA，随后我国学者陈炜等（1986）也从苹果锈果病树枝条上检出类病毒，确定了核糖核酸的碱基序列，并证明了这种类病毒的致病性，至此才确认了苹果锈果病是由一种类病毒引起的病害。日本学者 Hashimoto和 Koganezawa（1987）首次报道了 ASSVd全序列，确认其为类病毒。后来发现，苹果锈果类病毒也可以侵染梨树（Puchta et al，1990；Zhu et al，1995；郭瑞 等，2005；赵英和牛建新，2006，2007），但尚未见侵染核果类的报道。

本试验利用 RT-PCR技术从混植（苹果、梨、桃、杏）果园的杏树上扩增出了 ASSVd特异片段，并克隆了它的全长序列，其序列已在 GenBank上登录（EU031487～EU031496）。另外，利用合成的苹果锈果类病毒的 cDNA探针，通过斑点杂交检测，也证明杏树上有苹果锈果类病毒。在此基础上我们还利用原位 RT-PCR检测技术，证实杏树叶片的石蜡切片组织中有苹果锈果类病毒，并且主要分布在细胞核中。这些进一步证明，苹果锈果类病毒也可侵染杏树。此外，混植果园中杏树周围的苹果、梨也均检测了苹果锈果类病毒。至于是通过什么途径侵染到杏树中的，尚需进一步研究。

References

Chen Wei, Tian Bo, Jin Li-ping, Wang Guo-ping, Liu Fu-chang. 1986. Study of viroid RNA isolated from apple scar skin disease tissues. Chinese Journal of Virology, 2 (4): 79 - 84. (in Chinese)

陈 炜, 田 波, 金立平, 王国平, 刘福昌. 1986. 从苹果锈果病组织中分离到类病毒 RNA分子的研究. 病毒学报, 2 (4): 79 - 84.

Guo Rui, Li Shi-fang, Dong Ya-feng, Cheng Zhuo-min. 2005. Occurrence of apple scar skin disease and sequence analysis of *Apple scar skin viroid* in Liaoning. Acta Phytopathologica Sinica, 35 (5): 472 - 474. (in Chinese)

郭 瑞, 李世访, 董雅凤, 成卓敏. 2005. 苹果锈果类病毒辽宁分离物的克隆与序列分析. 植物病理学报, 35 (5): 472 - 474.

Hashimoto J, Koganezawa H. 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. Nucleic Acids Research, 15 (17): 7045 - 7052.

Hadidi A, Hansen A J, Parish C J, Yang X. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. Research in Virology, 142: 289 - 296.

Koganezawa H, Yanase H, Sakuma T. 1983. Viroid-like RNA associated with apple scar skin (or dapple apple) disease. Acta Horticulturae, 130: 193 - 197.

Niu Jian-xin, Zhou Min-sheng, Ma Bing-gang, Zhao Ying, Liu Hong. 2007. Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* in pear by in situ RT-PCR. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1): 53 - 58. (in Chinese)

牛建新, 周民生, 马兵钢, 赵 英, 刘 宏. 2007. 梨组织中苹果褪绿叶斑病毒的原位 RT-PCR检测. 园艺学报, 34 (1): 53 - 58.

Puchta H, Luckinger R, Yang X C, Hadidi A, Säenger H L. 1990. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid (ASSVd) from China. Plant Molecular Biology, 14 (6): 1065 - 1067.

Yang X, Hadidi A, Hammond R W. 1992. Nucleotide sequence of *Apple scar skin viroid* reverse transcribed in host extracts and amplified by the polymerase chain reaction. Acta Horticulturae, 309: 305 - 309.

Zhao Ying, Niu Jian-xin. 2006. Cloning and sequencing of Sinkiang isolate of *Apple scar skin viroid* (ASSVd). Journal of Fruit Science, 23 (6): 896 - 898. (in Chinese)

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

Zhao Ying, Niu Jian-xin. 2007. Detection of *Apple scar skid viroid* in pear cultivars by RT-PCR and spot hybridization in Xinjiang area. Journal of Fruit Science, 24 (6): 761 - 764. (in Chinese)

赵 英, 牛建新. 2007. 应用 RT-PCR和斑点杂交法检测新疆梨树上的苹果锈果类病毒. 果树学报, 24 (6): 761 - 764.

Zhu S F, Hadidi A, Hammond R W. 1995. Nucleotide sequence and secondary structure of pome fruit viroids from apple disease apples, pear rusty skin diseased pears and apple scar skin symptomless pear. Acta Horticulturae, 386: 554 - 559.