



李鹏举,侯帅,宋鹏慧,等.黑龙江省苹果茎沟病毒的分布及遗传多样性分析[J].黑龙江农业科学,2021(4):59-62.

# 黑龙江省苹果茎沟病毒的分布及遗传多样性分析

李鹏举,侯帅,宋鹏慧,杨光,房磊,段亚东

(黑龙江省农业科学院乡村振兴科技研究所,黑龙江哈尔滨 150028)

**摘要:**为促进黑龙江省苹果茎沟病的预防,从而加强优质苹果无毒苗木的推广和产业升级,本试验通过对在黑龙江省采集到的60份疑似感苹果茎沟病毒(ASGV)的苹果样品进行RT-PCR特异性检测,明确了ASGV在黑龙江省6大苹果产区的发生分布范围。结果表明:牡丹江地区、松花江平原地区的苹果植株带毒率达到100%,且苹果品种金红的ASGV发生率最低。ASGV CP序列同源性以及遗传多样性分析表明ASGV-MDJ与ASGV-SHJ具有较近的亲缘关系,与ASGV-DN的亲缘关系较远。这3份分离物与印度和中国台湾、山东、陕西等地的ASGV核苷酸一致率达到98.56%以上。

**关键词:**苹果茎沟病毒;分布;序列同源性;遗传多样性;亲缘关系

苹果不仅是人们日常饮食中必不可少的重要水果,同时也是我国渤海地区、华北内陆地区、西南丘陵地区以及西北黄土高原地区的重要农业支柱产业。然而,苹果的安全生产正受到多个方面的威胁,其中尤以苹果病毒病最为严重,可被39种病毒所侵染<sup>[1]</sup>。威胁我国苹果生产的病毒主要为苹果茎沟病毒(Apple Stem Grooving Virus, ASGV)、苹果花叶病毒(Apple Mosaic Virus, ApMV)、苹果茎痘病毒(Apple Stem Pitting Virus, ASPV)、苹果褪绿叶斑病毒(Apple Chlorotic Leaf Spot Virus, ACLSV)、苹果锈果类病毒(Apple Scar Skin Viroid, ASSVd)<sup>[2]</sup>。受病毒侵染的苹果植株,其正常的生理机能受到干扰,致使苹果植株长势减弱、果实畸形等不良症状,苹果的品质和产量受到严重影响<sup>[3-4]</sup>。

国外对苹果病毒病的研究较早,并且已经实现了苹果的安全无毒化种植,我国对苹果病毒病的研究始于20世纪80年代<sup>[5-7]</sup>。近年来,随着农业产业结构的不断调整,以及苹果种质的更新和栽培面积的迅速扩大,使我国苹果病毒病的发生情况逐年发生变化<sup>[8]</sup>。特别是对苹果茎沟病毒病的研究工作起步较晚,本文对黑龙江省6个苹果栽培区域进行采样并进行分子生物学以及遗传分析,以期预防黑龙江省苹果产区苹果茎沟病的发生提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于2014年在黑龙江省东宁盆地、牡丹江地区、松花江平原、西部风沙干旱区、克拜川岗寒冷区以及大兴安岭高寒区共6大果树产区种植的苹果植株进行韧皮部采样,共60份样品;pMD19-T载体(购自TaKaRa公司);2×Taq MasterMix、RNase-Free Water、RNA提取试剂盒(购自康维世纪);Amp、LB、大肠杆菌DH5a;DNA琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(购自TaKaRa公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 植物总RNA提取及反转录 参照李玲<sup>[9]</sup>报道的方法提取苹果植株韧皮部总RNA,并按照郝璐等<sup>[8]</sup>的方法进行RNA反转录反应。

1.2.2 ASGV PCR检测体系的构建 根据GeneBank上ASGV的外壳蛋白基因设计引物,其正向引物为:5'-GAGGATTTAGGTCCCTCTC-3',反向引物为:5'-GTATAAAGGCAG-GCATGTCAA-3'。PCR反应体系为:1 μL cDNA,上下游引物各1 μL(20 μmol·L<sup>-1</sup>),11 μL 2×Taq MasterMix,11 μL RNase-Free Water; PCR反应参数为:94℃预变性4 min,94℃变性40 s,57.5℃退火45 s,72℃延伸1 min,38次循环,而后72℃充分延伸10 min。

1.2.3 ASGV CP序列克隆和测序 对PCR特异性检测得到的阳性样品进行胶回收,分别连接到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌,对含有重组质粒的大肠杆菌样品送于华大基因进行测序。

1.2.4 ASGV DNA序列遗传多样性分析 ASGV CP序列相似性采用DNAMAN 6.0进行分析;系统进化树的构建采用MEGA 5.0软件中的

收稿日期:2021-01-07

基金项目:黑龙江省农业科学院青年基金项目(2020YYYY001);农业农村部园艺作物种质资源利用重点实验室开放基金(NYZS201907)。

第一作者:李鹏举(1977—),男,硕士,助理研究员,从事果树育种及栽培。E-mail:249939139@qq.com。

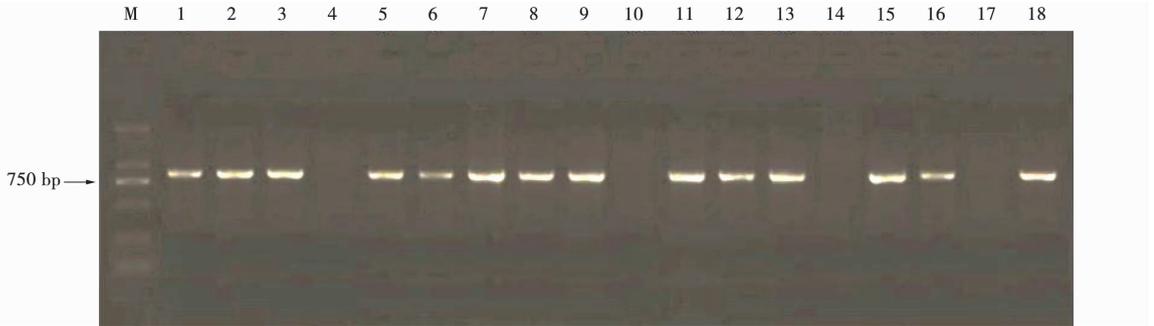
邻接法(Neighbor-joining),并进行1 000次bootstrap检验;遗传距离分析采用Clustal X2和MEGA 5.0软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 ASGV 病毒的检测

分别以采集的60份苹果植株韧皮部总RNA

为模板,利用设计的特异性引物进行PCR扩增,部分扩增条带如图1所示,本试验所设计的ASGV CP特异性引物,对黑龙江省苹果种植区的ASGV具有较好的检测效果,可以对扩增出的阳性样品条带进行胶回收,以及pMD19-T载体连接和序列测定。



M: Trans 2K DNA Marker; 1~3: 牡丹江地区样品; 4~6: 东宁盆地样品; 7~9: 松花江平原样品; 10~12: 西部风沙干旱区样品; 13~15: 克拜川岗寒冷区样品; 16~19: 大兴安岭高寒区

图1 黑龙江省部分地区ASGV的PCR检测

### 2.2 ASGV 病毒在黑龙江省的分布

通过对60份苹果植株样品的ASGV进行检测,明确了ASGV在黑龙江省6大果树种植区的分布。表1检测结果表明,ASGV在黑龙江省各苹果种植区均有发生,平均带毒率为81.26%,样本带毒率最高的是牡丹江地区、松花江平原地区,其苹果植株带毒率达到100%,克拜川岗寒冷区以及大兴安岭高寒区的苹果植株带毒率最低,达到66.68%。同时,调查表明6个地区所种植的主栽苹果品种龙丰和铃铛的ASGV病毒发生率较高,K9和金红的ASGV病毒发生率较低。

### 2.3 ASGV DNA 遗传多样性分析

通过对克隆到载体上的ASGV CP序列进行测序,去除冗余序列后,共得到3条差异性较大的ASGV CP基因序列,分别命名为ASGV-MDJ、ASGV-SHJ、ASGV-DN。将本试验测定得到的3条ASGV CP序列与GenBank上已登录的16个ASGV CP基因、2个CTLV基因以及外群(Cherry virus A) DNA CP序列进行多序列比对和进化树构建,由表2以及图2可知,ASGV牡丹江分离物(ASGV-MDJ)以及松花江分离物(ASGV-SHJ)具有较近的遗传距离,其CP序列核苷酸一致率为99.72%,并与我国山东(ASGV-JN)以及陕西(ASGV-EU)的ASGV分离物聚在Group I内,同时也与印度(ASGV-FM, ASGV-FN)的ASGV CP序列的核苷酸一致率达到98.56%,并

表1 黑龙江省不同地区主栽苹果品种ASGV的发生率

采样地点	品种	样品数/个	ASGV发生率/%
东宁盆地	金红	3	66.7
	铃铛	2	50.0
	龙丰	3	66.7
牡丹江地区	K9	2	100.0
	金红	3	100.0
	铃铛	3	100.0
松花江平原	龙丰	2	100.0
	K9	2	100.0
	金红	3	100.0
西部风沙干旱区	铃铛	2	100.0
	龙丰	3	100.0
	K9	3	66.7
克拜川岗寒冷区	金红	2	50.0
	铃铛	2	50.0
	龙丰	3	100.0
大兴安岭高寒区	K9	3	66.7
	金红	2	50.0
	铃铛	3	66.7
	龙丰	3	100.0
	K9	2	50.0

共同聚在 Cluster I 内; ASGV 东宁盆地分离物 (ASGV-DN) 与中国台湾 (ASGV-HM) 的 ASGV 具有 99.49% 的一致率, 但 ASGV-DN 与 ASGV-

MDJ、ASGV-SHJ 的同源性却仅有 98.77%, 说明 ASGV-MDJ 与 ASGV-SHJ 具有较近的亲缘关系, 但与 ASGV-DN 的亲缘关系较远。

表 2 ASGV 及 CTLV CP 基因全序列 GenBank 登入号

分离物来源	登入号	地区	分离物来源	登入号	地区
梨	AY886760.1	中国山东	苹果	EU236258.1	中国陕西
梨	FN393044.2	印度	苹果	FM204881.1	印度
梨	GQ330293.1	中国山东	苹果	FN599521.1	印度
苹果	LM651242.1	印度	苹果	HM352771.1	中国台湾
苹果	LN627005.1	印度	苹果	JN871587.1	中国山东
苹果	LN823990.1	印度	苹果	JX885579.1	中国山东
猕猴桃	HG796196.1	印度	苹果	KR606323.1	韩国
红蛇果	KJ617057.1	印度	柑橘	FJ223219.1	中国山东
复伞房蔷薇	LN559086.1	印度	柑橘	KP025671.1	中国山东
樱桃病毒 A	AB181355.1	日本			

由图 2 还可以看出, 感染苹果的 ASGV 与感染猕猴桃和梨的 ASGV 分别聚在 Cluster I、Cluster II、Cluster III。说明对于不同的侵染对象, ASGV 已经产生了定向的核苷酸变异, 以适应新的生存环境。

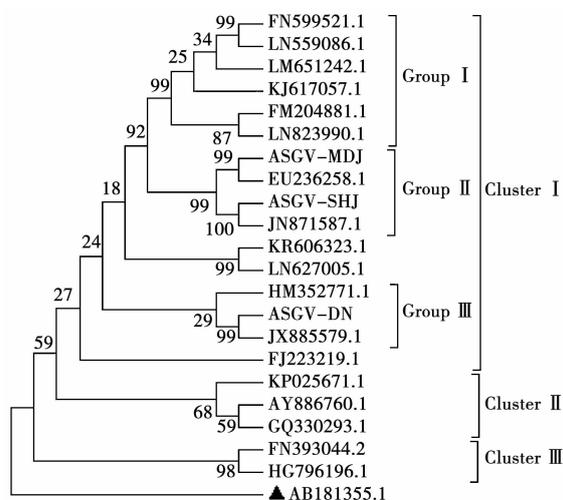


图 2 基于 ASGV CP 序列构建的系统进化树

### 3 结论与讨论

苹果 ASGV 病是我国苹果种植区普遍发生的一种病害, 主要是通过嫁接等无性繁殖方式进行传播, 并在感病苹果植株体内逐渐积累, 严重威胁苹果植株的健康生长<sup>[10]</sup>。黑龙江省位于我国东北部, 其主栽苹果品种也受到 ASGV 的威胁<sup>[11]</sup>。因此明确 ASGV 的分布对于 ASGV 的防控以及优质苹果无毒苗的定向栽培具有重要的指导意义。

目前, 对于 ASGV 的检测主要是通过 RT-PCR 的方法进行, 较以往的血清学检测以及酶联免疫检测<sup>[12]</sup> 具有较高的灵敏性和准确性<sup>[13-15]</sup>。本试验根据 ASGV 的 CP 序列设计特异性引物, 能够准确地检测到 ASGV 的存在, 对于 ASGV 的快速检测具有较好的应用价值。

本试验通过对在黑龙江省采集到的 60 份疑似感 ASGV 苹果植株进行检测, 发现在黑龙江省 6 大果树种植区均有 ASGV 的存在, 通过对 ASGV CP 核苷酸序列进行测定, 并与 GenBank 上去除冗余序列的 16 份 ASGV CP 核苷酸序列进行遗传多样性分析, 发现 ASGV-MDJ 与 ASGV-SHJ 具有较近的亲缘关系, 与 ASGV-DN 的亲缘关系较远。但都聚在 Cluster I 内, 且这 3 份分离物与印度、中国台湾和山东、陕西等地的 ASGV 的核苷酸一致率达到 98.56% 以上, 说明在黑龙江省苹果植株上检测到的 ASGV 很有可能是嫁接以及农事操作等方式引起 ASGV 在黑龙江省果树种植区的传播。因此, 为保障苹果植株的健康生长, 应在明确 ASGV 分布和预防的基础上, 加强对优质苹果无毒苗木的推广工作, 以促进我国苹果产业的升级。

牡丹江地区、松花江平原地区的苹果植株带毒率达到 100%, 且苹果品种金红的 ASGV 发生率最低。

ASGV CP 序列同源性以及遗传多样性分析表明 ASGV-MDJ 与 ASGV-SHJ 具有较近的亲

缘关系,与 ASGV-DN 的亲缘关系较远。这 3 份分离物与印度和中国台湾、山东、陕西等地的 ASGV 核苷酸一致率达到 98.56% 以上。

#### 参考文献:

- [1] 李小燕, 蔺国菊, 葛红霞, 等. 苹果病毒病发生及防治趋势[J]. 北方园艺, 2002(3): 66-67.
- [2] Ye T, Chen S Y, Wang R, et al. Identification molecular characterization of apple dimple fruit viroid in China[J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(3): 637-641.
- [3] 王亚南, 胡同乐, 刘淑香, 等. 我国苹果病毒病的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7933-7936.
- [4] 焦朝霞. 河北省苹果潜隐性病毒的分布特征[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [5] 刘福昌. 苹果病毒病的发生和研究现状[J]. 中国果树, 1987(4): 15-17.
- [6] 王小凤, 李秋波, 王荣, 等. 苹果褪绿叶斑病毒和苹果茎沟病毒的鉴定提纯和酶联检测[J]. 微生物学报, 1992, 32(2): 137-144.
- [7] Lee S H, Kim H R, Kim J H, et al. Improvement of RT-PCR sensitivity for fruit tree viruses by small scale dsRNA extraction and sodium sulfite[J]. Plant Pathology Journal, 2004, 20(2): 142-146.
- [8] 郝璐, 叶婷, 陈善义, 等. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 158-161.
- [9] 李玲. 苹果潜隐性病毒脱除及 RT-PCR 技术研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [10] 曹晓凤. 苹果茎沟病毒传播途径研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- [11] Li R, Mock R, Huang Q, et al. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154: 48-55.
- [12] Matic S, Sanchez-Navarro J A, Mandic B, et al. Tracking three inarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization[J]. Journal of Plant pathology, 2008, 90(1): 137-141.
- [13] 洪霓, 王国平, 于济民, 等. 苹果茎沟病毒的分离纯化及血清学检测[J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 6-12.
- [14] 张开春, 侯义龙, 胡文玉, 等. 采用 RT-PCR 技术检测苹果病毒[J]. 果树学报, 2001, 18(6): 370-371.
- [15] 李文慧, 牛建新. 苹果茎沟病毒 RT-PCR 检测技术[J]. 西北农业学报, 2006, 15(4): 105-107.

## Distribution and Genetic Diversity of Apple Stem Grooving Virus in Heilongjiang Province

LI Peng-ju, HOU Hao, SONG Peng-hui, YANG Guang, FANG Lei, DUAN Ya-dong

(Institute of Rural Revitalization Science and Technology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028, China)

**Abstract:** In order to promote the prevention of apple stem grooves disease in Heilongjiang Province, so as to strengthen the promotion of high quality apple non-toxic seedlings and industrial upgrading. In this study, 60 suspected samples of apple stem grooving virus(ASGV) was specific detection by RT-PCR in Heilongjiang Province. We defined the ASGV occurrence and distribution of Heilongjiang six major apple-producing areas. The results showed that, the apple plants infected ASGV rate of Mudanjiang area and Songhua river plains reached 100 percent. And then, the ASGV lowest disease incidence was 'golden red' apple varieties. ASGV CP sequence homology and genetic diversity analysis showed that ASGV-MDJ and ASGV-SHJ had a closer relationship, and a father kinship with ASGV-DN. The ASGV nucleotide consistent rate of three isolates in this trial with India, Chinese Taiwan, Shandong Province and Shaanxi Province more than 98.56%.

**Keywords:** apple stem grooving virus; distribution; sequence homology; genetic diversity analysis; kinship

欢迎投稿

欢迎订阅