

# 河北保定地区苹果锈果类病毒分离物的序列分析

杨金凤, 郭永斌, 胡同乐, 王树桐, 王亚南, 曹克强

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**以来自河北保定的苹果锈果类病毒(apple skin scar viroid, ASSVd)样本为试材, 采用 RT-PCR 方法对样本中的 ASSVd 全基因组序列进行扩增, 然后利用生物学软件 MEGA 6.0 对该分离物与已发表的其它分离物序列构建系统发育树, 对系统进化关系进行分析。结果表明: ASSVd 保定分离物基因组全长 332 nt, 将序列提交到 GenBank, 登录号为 KR264032。该分离物与已发表的其它 13 个来自不同寄主、不同国家的 ASSVd 分离物间进化关系极近, 核苷酸相似性为 92%~99%。与加拿大苹果上的 X71599 株系亲缘关系最近, 相似性为 99%, 仅在第 221 位有一个碱基差异, 与新疆梨上的 JX861259 株系亲缘关系最远。系统发育分析表明, 不同地区的 ASSVd 分离物聚类没有规律性, 说明 ASSVd 不存在地区专化性。新疆梨、桃、杏、苹果不在同一分支, 说明 ASSVd 可能存在一定的寄主特异性。二级结构预测表明, 该分离物的中央保守区与末端保守区与 ASSVd 其它序列相同。

**关键词:**苹果锈果类病毒; 保定; 序列分析; 二级结构

**中图分类号:**S 436.611.1<sup>+</sup>5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0103-04

类病毒(viroids)是一类由 246~401 个核苷酸组成的裸露 RNA 分子, 是迄今为止发现的最小致病病原, 能引起许多经济作物产生严重病害<sup>[1]</sup>。苹果锈果病又名花脸病或裂果病, 是对苹果危害较重的非潜隐性病毒之一, 也是中国苹果病毒的重要检疫对象<sup>[2]</sup>。苹果锈果病的病原为苹果锈果类病毒(apple skin scar viroid, ASSVd), 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科(Pospiviroidae)马铃薯纺锤块茎类病毒属(*Pospiviroid*), 别名苹果斑纹类病毒(dapple apple viroid, DAVd)、梨锈皮类病毒(pear rusty skin viroid, PRSVd)。通常约含 330 个核苷酸, 具有 5 个功能区, 能形成稳定的杆状和拟杆状的二级结构, 具有一个中央保守区(CCR)和一个末端保守区(TCR)<sup>[3]</sup>。陈炜等<sup>[4]</sup>1985 年首次在国内报道了 ASSVd, 日本学者 HASHIMOTO 等<sup>[5]</sup>首次报道了 ASSVd 的全基因组序列, 确认其为类病毒。郭瑞等<sup>[6]</sup>报道了 ASSVd 辽宁分离物序列。马伟等<sup>[7]</sup>对 ASSVd 山东栖霞分离物进行了

分子鉴定与序列分析。赵英等<sup>[8-10]</sup>对新疆 ASSVd 进行了检测与序列分析。吕文霞等<sup>[11]</sup>在北京发现了 ASSVd, 并进行了序列分析。现利用 RT-PCR 技术首次对河北保定地区 ASSVd 进行了鉴定和序列分析。并利用生物学软件 MEGA 6.0 对该分离物与已发表的其它分离物序列构建系统发育树, 对系统进化关系进行分析, 并将得到的 ASSVd 全基因组序列利用 CLC RNA Workbench 4 进行了二级结构预测。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料: 幼嫩枝条(“富士”苹果)于 2014 年 9 月采自保定顺平南神南显示病症苹果树。阴性对照为植物保护学院植物病害流行与综合防控研究室保存的健康苹果组培苗。

受体菌及主要试剂: 植物总 RNA 提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司; M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、DNA Marker、dNTPs、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、载体 pMD18-T、DNA 凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; DEPC、琼脂糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 $\times$ Es Taq Master Mix 购于北京康为世纪生物科技有限公司; 氯化钠、氯仿、 $\beta$ -巯基乙醇、无水乙醇、异丙醇购自保定市万科实验仪器贸易有限公司。

引物: 参照郭瑞等<sup>[6]</sup>的报道, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

**第一作者简介:**杨金凤(1989-), 女, 河北保定人, 硕士, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: yjf0896@163.com

**责任作者:**王亚南(1979-), 女, 河北三河人, 博士, 副教授, 现主要从事植物病毒学等研究工作。E-mail: wyn3215347@163.com

**基金项目:**国家苹果现代产业技术体系资助项目(CARS-28); 河北省高等学校科学技术研究资助项目(YQ2014023); 河北省青年拔尖人才计划资助项目。

**收稿日期:**2015-12-22

表 1 ASSVd RT-PCR 检测引物

Table 1 Primers used for RT-PCR detection of ASSVd

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	基因组位置 <sup>a</sup> Genome position <sup>a</sup>	片段大小 Product size/bp
ASSVd-3'	CCTTCGTCGACGACGACAGGTGAGT	73~97	329
ASSVd-5'	CCGGTGAGAAAGGAGCTGCCAGCA	98~121	

注:<sup>a</sup>序列位置参考序列的 NCBI 登录号为 X17696。

Note: Position reference sequences of NCBI registration number for X17696.

## 1.2 试验方法

1.2.1 苹果组织总 RNA 的提取 采用改良 RNA 提取法<sup>[12]</sup>,取 100 mg 植物组织,液氮研磨,加 0.5 mL 提取试剂进行提取,最后加入 20  $\mu$ L DEPC 水充分溶解 RNA, -70℃ 保存备用。

1.2.2 RT-PCR 检测 cDNA 合成:在预冷的 Microtube 管中加入 RNA 模板 3  $\mu$ L、特异性引物(20 pmol/ $\mu$ L)1  $\mu$ L、DEPC 水 2  $\mu$ L,轻轻混匀,离心数秒,70℃ 变性 10 min,迅速冰上冷却 2 min 后,依次加入 5 $\times$ M-MLV 缓冲液 2  $\mu$ L, dNTPs(2.5 mmol/L)0.5  $\mu$ L, RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L)0.25  $\mu$ L, M-MLV(200 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L, DEPC 水 0.75  $\mu$ L, 42℃ 水浴 1 h, 70℃ 灭活 15 min, -20℃ 保存。PCR 扩增:PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 含 2 $\times$ Es Taq MasterMix 12.5  $\mu$ L、正反向引物(20 pmol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L、反转录产物 0.5  $\mu$ L,最后加 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 1 min,60.9℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;于 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

1.2.3 序列测定与分析 将 PCR 产物于 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液,1.5% 琼脂糖电泳分离,上样量 8  $\mu$ L,100 V 稳压电泳 40 min,EB 染色后观察结果。PCR 产物切胶回收、纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,在含有氨苄青霉素的 LB 平板培养基上 37℃ 培养过夜,PCR 筛选阳性克隆,委托华大基因科技股份有限公司进行测序。采用 Clustal X 1.8 和 MEGA 6.0 软件将所得分离物序列与 GenBank 中已报道的 ASSVd 序列进行比较分析。利用 CLC RNA Workbench 4 进行二级结构预测。

## 2 结果与分析

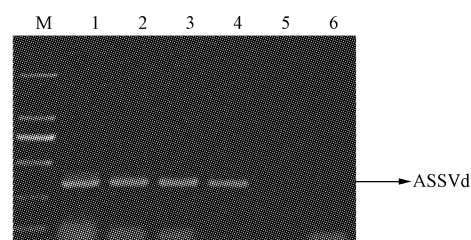
### 2.1 RT-PCR 扩增

以病样提取的 RNA 为模板,以健康植株提取的 RNA 作阴性对照,以 ASSVd 引物进行 RT-PCR 反应,阳性样品扩增出预期大小的目的片段,而健康样品没有扩增出条带(图 1)。

### 2.2 序列测定及分析

ASSVd 保定分离物基因组全长 332 nts,将序列提交到 GenBank,登录号为 KR264032。由表 2 可知,该分离物与已发表的其它 13 个来自不同寄主、不同国家的 ASSVd 分离物间进化关系极近,核苷酸相似性为 92%~99%。与加拿大苹果上的 X71599 分离物亲缘关系最近,同源性最

高为 99%,仅在第 221 位多 1 个碱基 T,与新疆梨上的 JX861259 分离物亲缘关系最远。系统发育分析表明:ASSVd 分离物与外群各自独立为一支,其它 14 个分离物归类到 2 个组群,河北保定分离物与加拿大分离物聚在一个亚组。不同地区的 ASSVd 分离物聚类没有规律性,说明 ASSVd 不存在地区专化性。新疆梨与桃、杏、苹果不在同一分支说明 ASSVd 存在一定的寄主特异性(图 2)。



注:M,DL 2 000;1~4,带毒样品;5~6,健康样品。

Note:M,DL 2 000;1-4,samples with virus;5-6,samples of health.

图 1 苹果锈果类病毒 RT-PCR 检测

Fig. 1 RT-PCR detection for ASSVd

表 2 ASSVd 河北保定分离物与其它分离物序列相似性分析

Table 2 Identity of nucleotide sequence of KR264032 with ASSVd variants in GenBank

登录号 Accession number	地区 Area	寄主 Host	相似性 Identity/ %
HQ840722	Beijing	apple	94
AF421195	Korea	apple	98
EU825613	South Korea	apple	98
AY972082	Liaoning	apple	98
GQ249349	Greece	apple	98
X71599	Canada	apple	99
HM367077	Shandong	apple	98
EU031466	Xinjiang	apple	95
HQ326094	Iran	apple	94
AM993160	India	apple	93
JX861259	Xinjiang	pear	92
EU031479	Xinjiang	peach	95
EU031496	Xinjiang	apricot	93

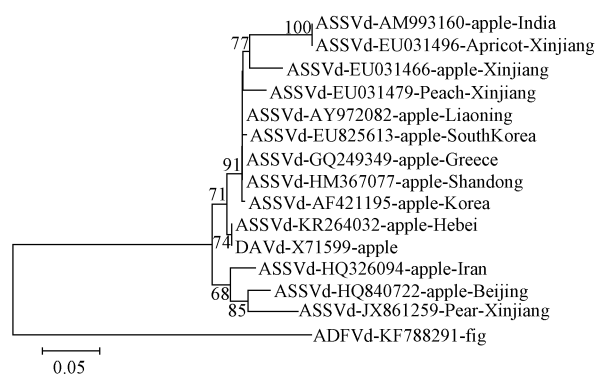


图 2 ASSVd 系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic relationship of ASSVd



DOI:10.11937/bfyy.201606026

# 不同激素配比对铁皮石斛组培丛生芽增殖的影响

杨平飞, 吴明开, 宋智琴, 张金霞, 李娟, 杨琳

(贵州省现代中药材研究所, 贵州 贵阳 550006)

**摘 要:**以铁皮石斛为试材,以 MS 为基本培养基,研究了不同激素比对铁皮石斛组培丛生芽增殖的影响。结果表明:铁皮石斛丛生芽增殖的培养条件为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+土豆汁 100 g/L+蔗糖 30 g/L,90 d 增殖系数达 7.00,丛生芽芽高、茎径、含水量和叶绿素含量均高于其它处理。

**关键词:**铁皮石斛;丛生芽;增殖培养

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0106-03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为多年生草本兰科珍稀药用植物,有滋阴益胃,清热生津,提高人体免疫功能、防治肿瘤和延年益寿等功效<sup>[1]</sup>,被广泛应用于临床和日常生活保健。铁皮石斛野生资源被采挖殆尽已濒临枯竭,被国家列为重点保护药用植物<sup>[2]</sup>。铁皮石斛种子因无胚乳,在自然条件下繁殖率极低,采用传统的分株繁殖法繁殖速度慢<sup>[3]</sup>。铁皮石斛采用种子无菌萌发、原球茎生长、丛生芽增殖、壮苗培养与练苗驯化获得

大量种苗技术比较成熟<sup>[4-5]</sup>。铁皮石斛组织培养过程中,丛生芽的增殖非常关键,是降低铁皮石斛种苗生产成本、获得优质高产种苗的重要环节,目前尚鲜见相关研究<sup>[6-8]</sup>,现开展 6-BA 和 NAA 不同配比对铁皮石斛丛生芽增殖影响研究,筛选出丛生芽增殖的较佳培养条件,以期铁皮石斛规模化规范化育苗提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料铁皮石斛蒴果由安龙县欣蔓生物科技有限责任公司提供。

### 1.2 试验方法

试验在贵州省农业生物技术重点实验室组培室开展。以 MS 培养基作为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA 和 NAA(表 1),琼脂添加量为 7.2 g/L,蔗糖添加量为 30 g/L,土豆添加量为 100 g/L。选取大小和长势一致的丛生芽接种到不同激素配比的培养基中,每处理 30 瓶,每瓶接 5 个芽,于光照强度 1 200 lx、光照时间为 12 h/d、温度为(25±2)℃、湿度为 30%~50%的组培室

**第一作者简介:**杨平飞(1988-),男,贵州长顺人,硕士,研究实习员,现主要从事中药材栽培生理等研究工作。E-mail:505092100.my@163.com.

**责任作者:**吴明开(1970-),男,安徽枞阳人,博士,研究员,现主要从事中药材资源多样性保护和利用及育种与栽培等研究工作。E-mail:bywmk1999@163.com.

**基金项目:**“贵州珍稀药材石斛、白及品种选育及其产业化”资助项目(黔农科院自主创新科研专项字(2014)017号);贵州省农业委员会资助项目(GZCYTX2014-0202);贵州省中药现代化科技专项资助项目(黔科合中药字[2013]5033号)。

**收稿日期:**2015-12-14

relationship was analyzed. The results showed that the full length genome of ASSVd BD-1 was 332 nt, which had been submitted to GenBank (accession number: KR264032). The isolate had close evolution relationship to the other 13 isolates with nucleotide similarity among 92%—99%. ASSVd BD-1 showed the highest identity (99%) with the isolate DAVd (GenBank accession number: X71599) from apple in Canada and only one nucleotide difference in 221st site. It showed the lowest identity with isolate ASSVd -Z7 (GenBank accession number: JX861259) from pears in Xinjiang. Phylogenetic analysis showed there was no correlation between the region and molecular variation of ASSVd. The isolates of pear, peach, apricot, apple in Xinjiang were not in the same cluster, which suggested that there was certain correlation between the host type and molecular variation of ASSVd. The result of secondary structure prediction showed that the sequences of the central conserved region and terminal conserved region were identical to the reported ASSVd reference sequence.

**Keywords:** apple skin scar viroid; Baoding; sequence analysis; secondary structure