

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2016)01-0031-08

病虫害防治

马铃薯纺锤块茎类病毒内蒙古分离株的克隆及序列分析

王 建, 迟胜起*, 韩 磊, 张剑峰*, 梁文星

(青岛农业大学农学与植保学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 采用内蒙古自治区采集的感染马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)的马铃薯材料, 克隆了PSTVd的全长基因, 命名为内蒙古分离株(PSTVd-IM), 对其序列进行分析。结果表明, 该序列大小为359 bp, 其与俄罗斯的PSTVd分离株(EF044305.1)序列吻合。将该分离物与国内外已经报道的PSTVd株系进行了比较, 构建了系统进化树, 确定了其分类地位; 通过序列比对和二级结构分析, 发现PSTVd-IM与已报道的PSTVd三类致病类型株系: 强株系(U23058.1)、中间株系(AY937179.1)和弱株系(M14814.1)的同源性分别为97.78%, 98.61%和99.44%; 且与这三种类型株系在中央保守区、致病区和可变区结构域存在差异, 说明这些结构域可能与其致病性相关。PSTVd-IM的序列与二级结构分析有利于明确其来源及致病性的差异位点, 对于PSTVd的致病机制的研究具有重要意义。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒; 反转录-聚合酶链式反应; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of Potato Spindle Tuber Viroid Isolate from Inner Mongolia

WANG Jian, CHI Shengqi*, HAN Lei, ZHANG Jianfeng*, LIANG Wenxing

(College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The whole gene of potato spindle tuber viroid (Potato spindle tuber viroid, PSTVd), named PSTVd-IM, which was isolated from the diseased potato from Inner Mongolia, was cloned and sequenced in this research. The results showed that it had 359 bp and its sequence was the same as the isolate EF044305.1 from Russia. The phylogenetic tree of PSTVd isolate was built and analyzed based on the full-length nucleotide sequence of isolates from NCBI by MEGA5.1, which showed relatedness of PSTVd-IM with the isolates published. At the same time, homology analysis and second structure analysis of PSTVd-IM with different pathogenic PSTVd strains (severe strain U23058.1, intermediate strain AY937179.1 and weak strain M14814.1) were done to show the difference among them. This research would lay the foundation for studying the pathogenic mechanism.

Key Words: potato spindle tuber viroid; RT-PCR; sequence analysis

马铃薯生产中通常采用无性繁殖, 容易感染多种病害, 其中病毒病是引起马铃薯种薯退化和商品减产的主要原因。马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato

spindle tuber viroid, PSTVd)是影响马铃薯生产的重要病原之一。PSTVd是第1个被发现的类病毒^[1], 隶属于马铃薯纺锤块茎类病毒科(Pospiviroidae)。

收稿日期: 2015-06-05

基金项目: 山东现代农业产业技术体系薯类创新团队(SDAIT-10-011-06); 山东省“泰山学者”建设工程资助。

作者简介: 王建(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事马铃薯病毒研究。

*通信作者(Corresponding author): 迟胜起, 副教授, 主要从事马铃薯病毒病害研究, E-mail: chishq@163.com; 张剑峰, 教授, 主要从事马铃薯病毒病害研究, E-mail: gauzjf@163.com。

PSTVd是没有蛋白质外壳包被的裸露的单链环状RNA分子, 仅360 bp左右, 不编码蛋白质, 但并不意味着没有生物学功能, 在短短的核酸序列中集中了类病毒的许多生物学功能。PSTVd拥有环状结构和高度的自我互补性, 为了减少自由能, 很容易压缩成棒状二级结构^[2], 形成5个功能区^[3,4]: 左末端区(TL, 1~6/315~359); 致病区(P, 47~73/286~314); 中央保守区(C, 74~120/240~285); 可变区(V, 121~148/212~239); 右末端区(TR, 149~179/180~211)。共可形成27个环(Loop), 其中多个环参与系统移动(Trafficking, T), 多个环参与了复制(Replication, R)^[5]。PSTVd的左末端区、右末端区^[4]和中央区^[6]参与了症状的表达。致病区外E环结构域(Loop E motif)是中央保守区的一部分, 其中含有进化上保守的序列GAAA, 在PSTVd复制过程中, 对类病毒分子的最终环化起作用^[7]。在所有类病毒中, 致病区少数几个核苷酸(约1%核苷酸)的变化即可改变病害症状的严重程度。

PSTVd具有高度的侵染性, 极易通过接触农具、衣物和切刀等进行汁液传播, 也能通过水进行传播^[8], 也可通过花粉和子房传到种子中, 也可介体昆虫、块茎传播。PSTVd可在马铃薯的任何生育时期进行侵染, 并表现多种症状, 潜伏期长, 给马铃薯生产带来了巨大的威胁。马铃薯在受到PSTVd侵染时, 通常减产30%左右, 严重时高达90%^[9]。PSTVd能与其他病毒进行互作, 如随马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)粒体在蚜虫中进行传播^[10]; PSTVd与PVY复合侵染对PVY有增殖作用^[11], 复合感染常造成更大的经济损失。PSTVd的致病性具有强株系、弱株系和中间株系。PSTVd强株系可引起减产60%~70%, 弱株系减产20%~35%^[12]。PSTVd的寄主范围很广, 可侵染31科90多种植物, 如龙葵、洋酸浆、黄花烟、心叶烟、德伯尼烟、假酸浆、莨菪以及茄子。马铃薯很多品种都易被感染, 表现出不同程度的形态变化和产量损失^[13]。马铃薯纺锤块茎类病毒很难通过茎尖剥离技术汰除, 目前还没有脱掉该类病毒的有效措施^[14]。

本研究通过2步RT-PCR方法, 对来自内蒙古自治区具有PSTVd症状的马铃薯植株进行扩增, 得到了PSTVd的cDNA克隆(PSTVd-IM), 对PSTVd-IM内蒙株系的基因结构的分析, 初步确定

其来源及其特点, 开展该类病毒基因相关结构及致病性分析, 为今后PSTVd的深入研究和防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 感病材料

感病马铃薯2013年采自内蒙古自治区商都田间。

1.1.2 试验试剂

反转录酶M-MLV购于Genview, RNAiso Plus试剂盒、Agrose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0购于鼎国公司, 克隆载体pMD-19T, DNA回收试剂盒, rTaq, dNTPs, 质粒小提取试剂盒(Fast Plasmid Minikit)均购自TaKaRa公司。

1.1.3 菌种

大肠杆菌Escherichia coli JM109感受态由本实验室保存。

1.1.4 引物设计

PSTVd基因特异性引物: 正向引物1F: 5'-ATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAAC-3', 反向引物2C: 5'-CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG-3'。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯叶片总RNA的提取

染病马铃薯发芽后, 称取新鲜马铃薯叶片按TaKaRa RNAiso Plus试剂盒操作手册进行操作, 最后溶于RNase-free的灭菌DEPC水中, 待RNA沉淀完全溶解后于-80℃保存。

1.2.2 cDNA的合成及PCR扩增

以感病植株总RNA为模板, 2C为反转录引物, 合成cDNA的第一链, 体系为总RNA 5 μL, 20 μmol/L下游引物 2 μL, RNase Free H₂O 4 μL, 88℃变性10 min, 冰上冷却3 min, 37℃保温20 min。然后加入M-MLV(RNaseH-)(50 U/μL)0.25 μL, RNase Inhibitor(20~40 U/μL)0.5 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol each) 2 μL, 5×M-MLV Buffer 4 μL, 后用RNase Free H₂O补足20 μL。反应条件为42℃ 60 min, 70℃ 15 min, 冰上冷却即合成cDNA第一条链。

以cDNA第一链为模板进行PCR扩增, 反应体系: rTaq DNA聚合酶(5 U/μL)0.25 μL, 上游引物(20 μmol/L)0.5 μL, 下游引物(20 μmol/L)0.5 μL,

10 × PCR Buffer 5 μL, dNTPs Mixture (2.5 mmol each) 4 μL, ddH₂O 补足 50 μL。程序为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物的克隆及序列测定

PCR 扩增产物用 DNA 回收试剂盒回收, 回收产物和 pMD19-T 载体进行连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 涂布在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 挑取单菌斑, 筛选阳性克隆, 随机挑选 3 个阳性克隆, 由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 马铃薯总 RNA 的提取

利用 TaKaRa RNAiso Plus 试剂盒进行马铃薯总

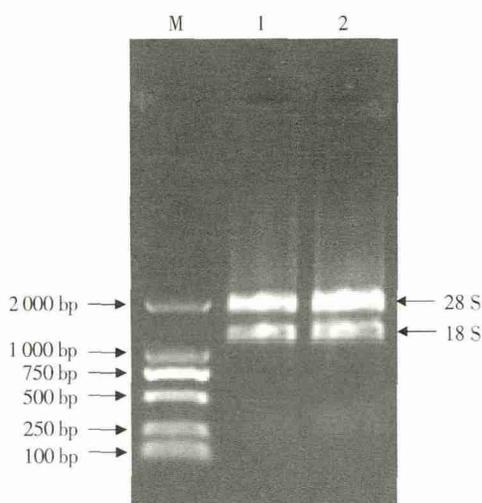
RNA 提取, 由图 1 可见, 在 1% 琼脂糖凝胶上马铃薯叶片总 RNA 条带清晰, 28 S 大约是 18 S 的两倍, RNA 几乎没有降解, 样品质量较好, 可用于下一步的 RT-PCR。

2.2 PSTVd-IM 的克隆

利用 PSTVd 基因的特异性引物 1F 和 2C, 经 RT-PCR 扩增后, 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 得到一条大小约 360 bp 的特异 DNA 片段, 与预期设计的 PSTVd 的全长基因片段大小一致(图 2)。经测序, PSTVd-IM 分离物含有 359 bp 碱基(图 3), 由此已经获得全长的 PSTVd-IM 克隆。

2.3 PSTVd 全长核苷酸序列构建系统进化树

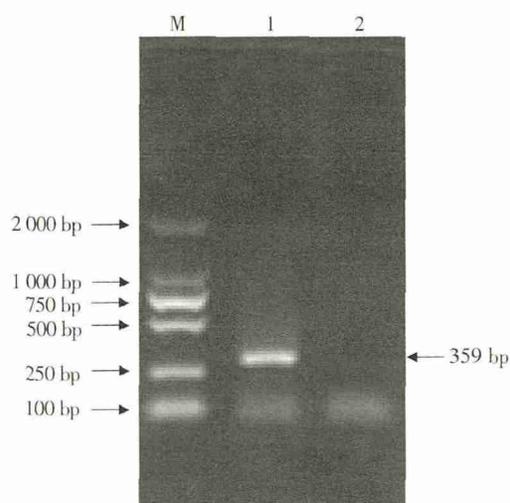
将所获得的 PSTVd-IM 与 NCBI 已公布的 127 个全长 PSTVd 分离物核苷酸序列, 利用 MEGA5.1 软件, 采用邻连法建立了 PSTVd 不同分离物的系统进化树(图 4)。结果表明, PSTVd 的聚类主要可以



M: 2 000 bp Marker; 1: 病株; 2: 健株。
M: 2 000 bp Marker; 1: Diseased plant; 2: Healthy plant.

图 1 马铃薯总 RNA 的提取

Figure 1 Extraction of total potato RNA



M: 2 000 bp Marker; 1: 病株; 2: 健株。
M: 2 000 bp Marker; 1: Diseased plant; 2: Healthy plant.

图 2 PSTVd-IM 的 RT-PCR 克隆

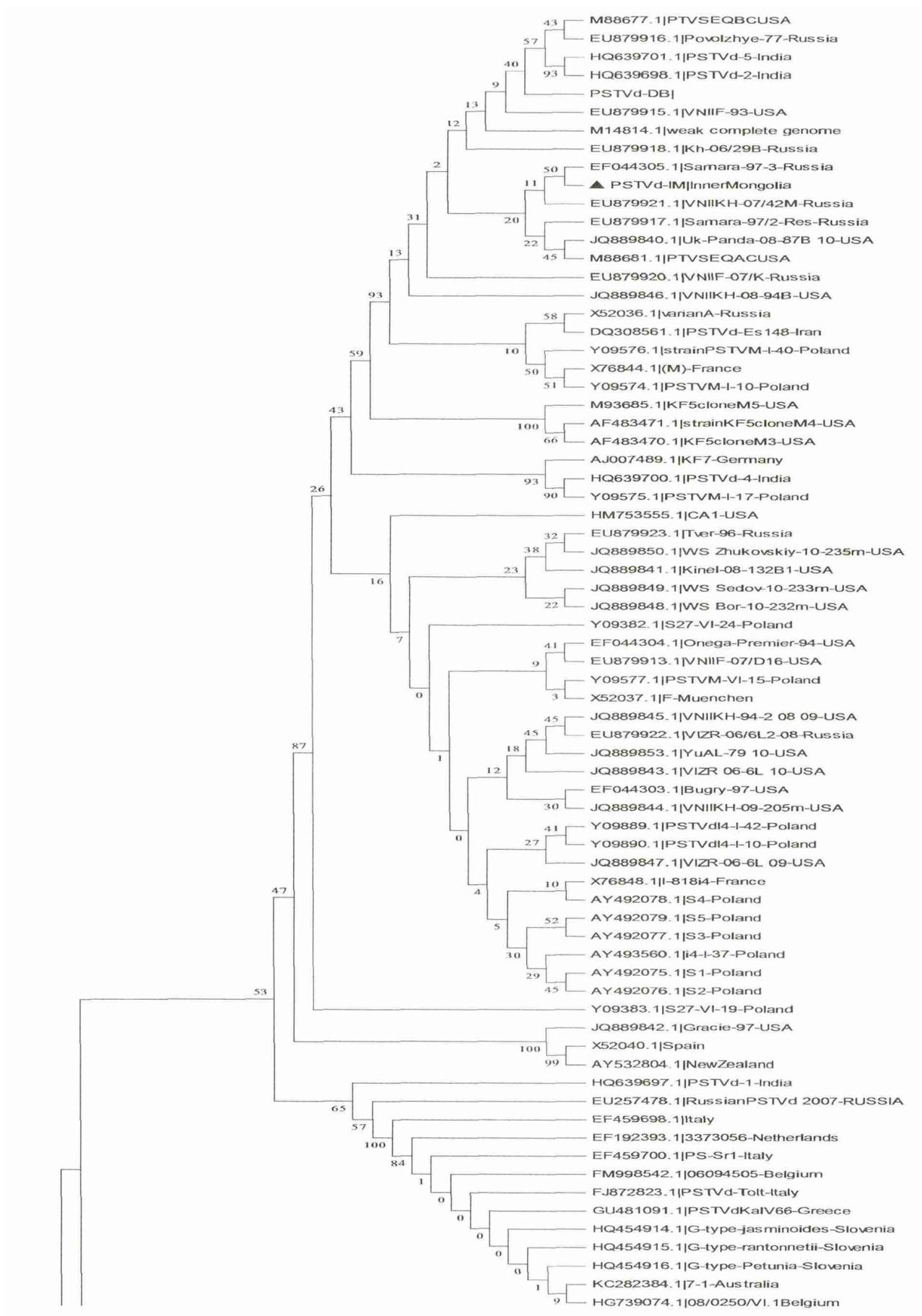
Figure 2 Cloning of PSTVd-IM by RT-PCR

```

1   CGGAATAAA CTCGTGGTTC CTGTGGTTCA CACCTGACCT CCTGAGCAGA AAAGAAAAAA
61  GAAGGCGGCT CGGAGGAGCG CTTCAGGGAT CCCCAGGGAA ACCTGGAGCG AACTGGCAAC
121 AAGGACGGTG GGGAGTGCCC AGCGGCCGAC AGGAGTAATT CCCGCCGAAA CAGGGTTTTTC
181 ACCCTTCCTT TCTTCGGGTG TCCTTCCTCG CGCCCGCAGC ACCACCCCTC GCCCCCTTTG
241 CGCTGTCGCT TCGGTTACTA CCCGGTGGAA ACAACTGAAG CTCCCAGAGAA CCGCTTTTTT
301 TCTATCTTTC TTGCTTCGG GCGGAGGGTG TTTAGCCCTT GGAACCGCAG TTGGTTCTT
    
```

图 3 PSTVd-IM 基因序列

Figure 3 Full-length sequence of PSTVd-IM



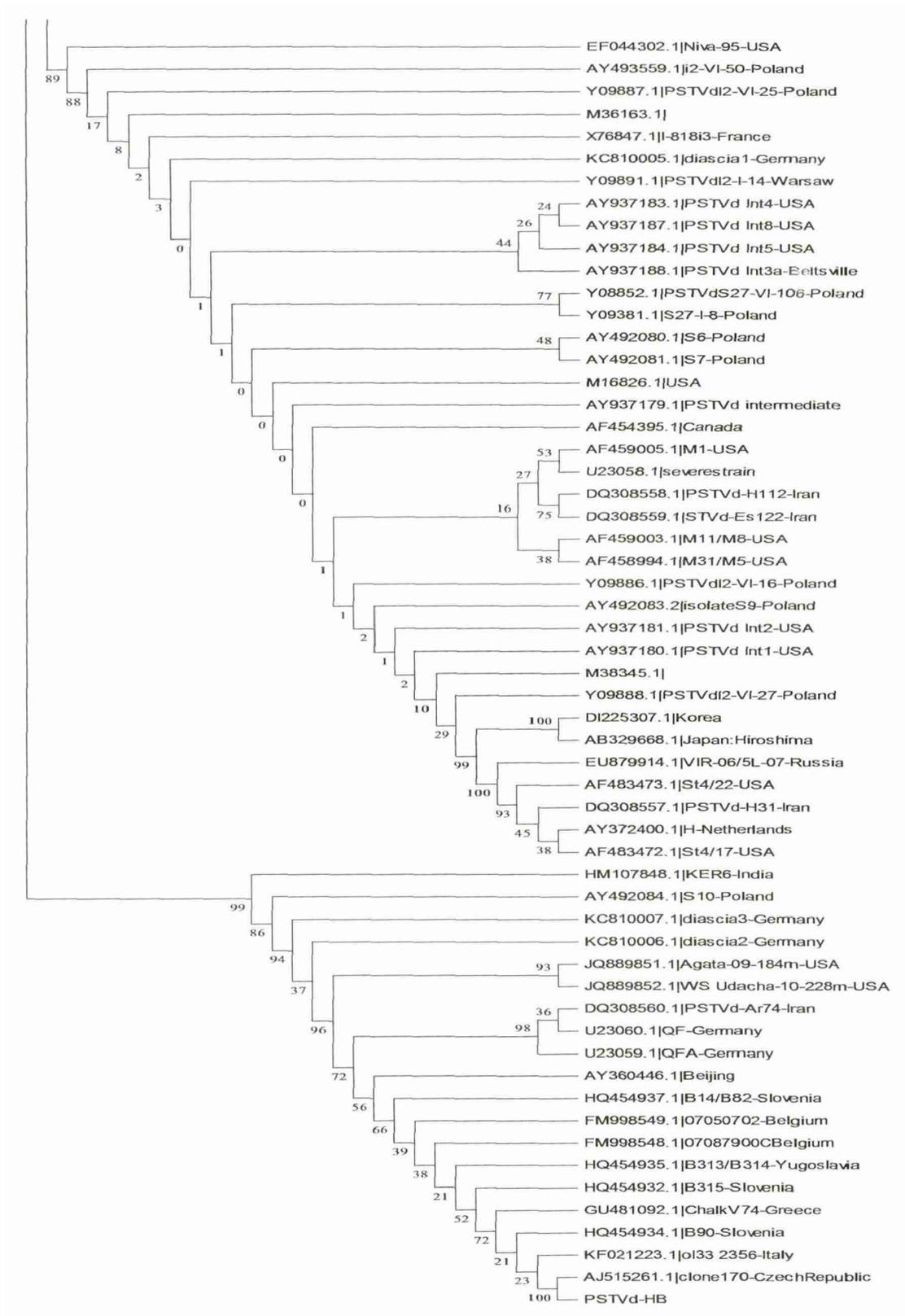


图4 依据PSTVd全长核苷酸序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of PSTVd isolates based on full-length nucleotide sequence

分为3大分支, 其国内已公布的4个全长的PSTVd分离物(PSTVd-HB, AY360446.1(北京), PSTVd-IM, PSTVd-DB(黑龙江)), 分属其中2个大分支, PSTVd-IM与PSTVd-DB(黑龙江)聚在一支, PSTVd-HB和AY360446.1(北京)聚在一支, 且2者亲缘关系较远, 说明国内至少存在2个差异较大的PSTVd株系; 本研究所获得的PSTVd-IM与源于俄罗斯PSTVd分离株EF044305.1关系最近, 通过序列比对发现两者序列同源性100%; 由图4同时也可以看出, 不同区域的PSTVd序列呈现多态性。

2.4 PSTVd-IM与PSTVd强株系、中间株系、弱株系的结构差异

将PSTVd-IM与强株系(U23058.1)、中间株系(AY937179.1)和弱株系(M14814.1)进行了系列比对和二级结构分析, 由图5可以看出PSTVd-IM与强、中、弱3个株系的同源性分别为: 97.78%,

98.61%和99.44%。用CLC RNA WorkBench 4.0软件对四者的二级结构进行了分析, 结构表明, 其中有3个结构域存在着差异(图6)。

由图6可以看出, 在致病区PSTVd-IM和弱株系在310位碱基由A突变为U, 导致其二级结构发生改变, 而强株系和中间株系没有发生变化; 在中央保守区, 由于123位核苷酸的缺失, 导致PSTVd-IM和弱株系在237~246位的二级结构发生变化, 而强株系和中间株系不发生缺失; PSTVd-IM在255位由碱基C突变为U, 导致二级结构发生变化, 而强株系、中间株系和弱株系均没有发生改变, 这是否会对其致病性带来变化, 还有待进一步的研究; 在可变区, PSTVd-IM和弱株系120位核苷酸分别由A突变为C和U, 对其自身的二级结构不产生影响, 但这却导致弱株系和PSTVd-IM的结构域与强株系和中间株系的结构域发生了变化。

U23058.1__severe_strain.seq	CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGACAAGAAAAGAAAAA	60
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----gc-----	60
M14814.1__weak_strain.seq	-----gc-----	60
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-----gc-----	60
U23058.1__severe_strain.seq	GAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAA	120
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----	120
M14814.1__weak_strain.seq	-----t	120
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-----c	120
U23058.1__severe_strain.seq	AAAGGACGGTGGGAGTGCCACGGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTTT	180
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----	180
M14814.1__weak_strain.seq	-.-----	179
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-.-----	179
U23058.1__severe_strain.seq	CACCCCTTCCTTCTCGGGTGCTCCTCGCGCCCGCAGGACCACCCCTCGCCCTTT	240
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----	240
M14814.1__weak_strain.seq	-----	239
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-----	239
U23058.1__severe_strain.seq	GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCGGTGGAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTT	300
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----	300
M14814.1__weak_strain.seq	-----	299
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-----t-----	299
U23058.1__severe_strain.seq	CTCTATCTTACTT.GCTCCGGGCGAGGGTGTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTCCT	359
AY937179.1__intermediate_strain.seq	-----t-----	359
M14814.1__weak_strain.seq	-----t-t-t-----	359
PSTVd-IM__InnerMongolia.seq	-----t-t-t-----	359

强株系(U23058.1); 中间株系(AY937179.1); 弱株系(M14814.1); PSTVd-IM。

Severe strain (U23058.1); intermediate strain (AY937179.1); weak strain (M14814.1); PSTVd-IM.

图5 PSTVd-IM与不同致病性株系的同源性分析

Figure 5 Homology analysis of PSTVd-IM with different pathogenic PSTVd strains

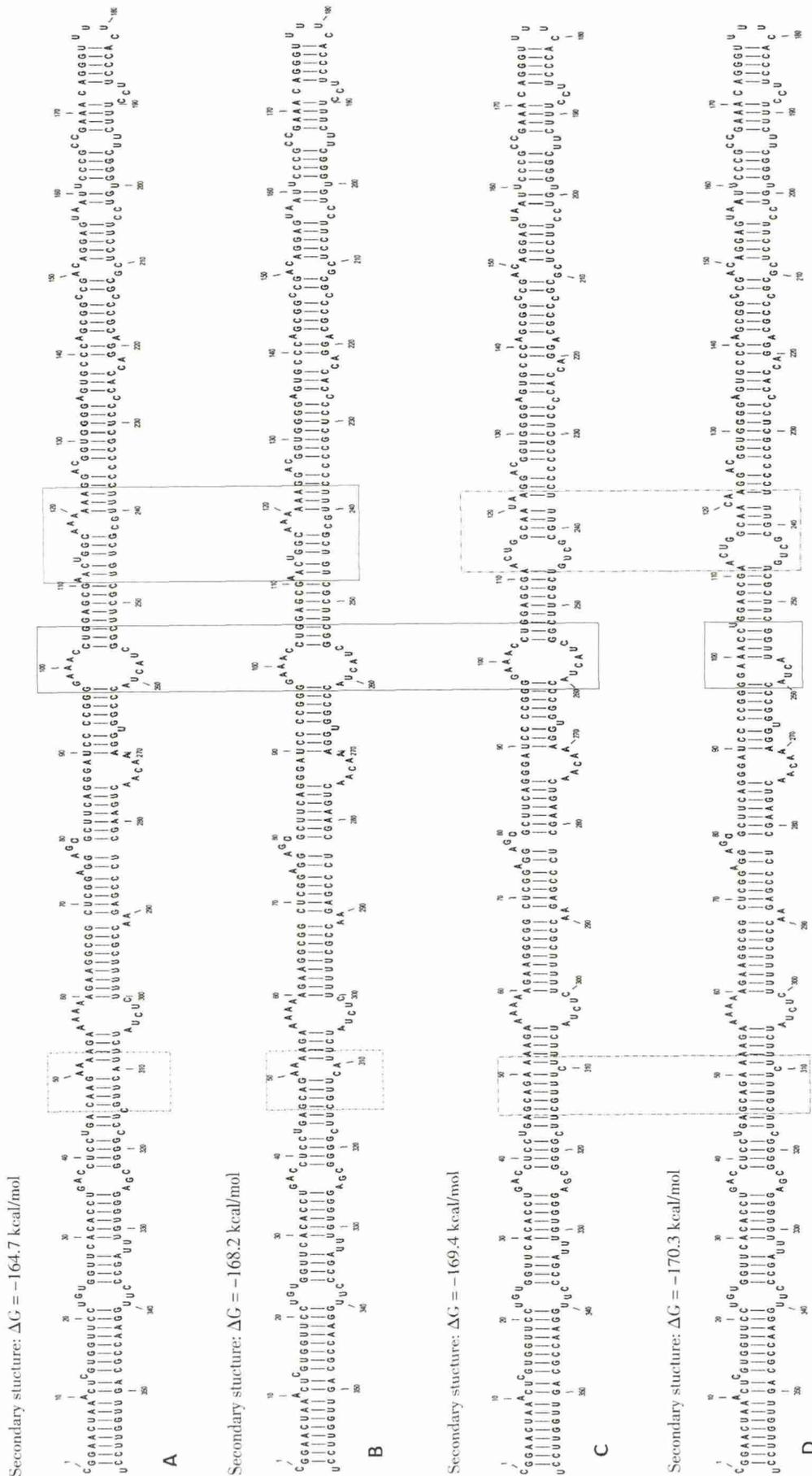


图 6 PSTVd-IM 与不同致病性株系的 PSTVd RNA 二级结构的分析
 Figure 6 RNA secondary structure analysis of PSTVd-IM and various pathogenic PSTVd strains

3 讨 论

PSTVd的分子很小, 仅有359 bp, 其二级结构的稳定性与其致病性相关, 其微小的变化就有可能导致变异。何小源等^[15]的研究也证实了PSTVd强毒株系和弱毒株系仅仅相差3个核苷酸, 二级结构的变化也与之相关。研究发现, 致病区外E环结构域(Loop E motif)的1个核苷酸的改变就能影响PSTVd的致病性和其寄主选择性。PSTVd(KF44022分离物)259位核苷酸由C突变为U可以扩大马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的寄主范围, 使之可以感染烟草^[16]; PSTVd-Int 257位核苷酸由U突变为C或A, 可使PSTVd-Int在烟草原生质中的复制率提高5~10倍, 并且由U到A的突变可导致中等致病力的PSTVd-Int转变为致死株系^[17]。通过PSTVd-IM与不同致病性菌株的二级结构差异的比较, 发现其与弱株系的二级结构相似, 但其致病力终究如何还有待于进一步的验证, 这些结构域的突变分析将有助于PSTVd致病性机制的深入研究。

由PSTVd全长序列构建的系统发育树可以看出, 现在已发现的PSTVd菌株大致可以分为3个大的分支, 中国已经拥有其中的2个分支。同时, 从PSTVd的系统发育树也能看出, 中国现存的内蒙株系和东北株系均与俄罗斯的PSTVd株系亲缘关系密切, 河北和北京株系则与欧洲的PSTVd株系关系密切, PSTVd近几年在北方发生呈上升趋势, 加强PSTVd的检测, 有利于阻止PSTVd的传播和防治, 建立完善的PSTVd的检测体系, 是现阶段防止PSTVd扩散的有效措施。

[参 考 文 献]

- [1] Diener T. Potato spindle tuber virus: IV. A replicating, low molecular weight RNA [J]. *Virology*, 1971, 45(2): 411-428.
- [2] Sanger H L, Klotz G, Riesner D, *et al.* Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [3] Keese P, Symons R H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(14): 4582-4586.
- [4] Sano T, Candresse T, Hammond R W, *et al.* Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(21): 10104-10108.
- [5] Ding B. The biology of viroid-host interactions [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47, 105-131.
- [6] Qi Y J, Pélissier T, Itaya A, *et al.* Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(7): 1741-1752.
- [7] Baumstark T, Schröder A R W, Riesner D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation [J]. *EMBO Journal*, 1997, 16(3): 599-610.
- [8] Mehle N, Gutiérrez-Aguirre I, Prezelj N, *et al.* Survival and transmission of potato virus Y, pepino mosaic virus, and potato spindle tuber viroid in water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(4): 1455-1462.
- [9] 董代幸, 罗明, 王丽丽, 等. 乌鲁木齐地区马铃薯纺锤块茎类病毒的检测与序列分析 [J]. *西北农业学报*, 2010, 19(9): 38-42, 65.
- [10] Syller J, Marczewski W, Pawowicz J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles [J]. *European Journal of plant pathology*, 1997, 103(3): 285-289.
- [11] 刘卫平. 马铃薯类病毒与马铃薯Y病毒的互作及其对马铃薯产量的影响 [J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2007(1): 40-43.
- [12] 白云凤, 闫建俊, 张耀, 等. 马铃薯纺锤块茎类病毒山西分离物侵染性克隆的构建 [J]. *山西农业科学*, 2012, 40(7): 701-704.
- [13] 邱彩玲, 吕文河, 吕典秋, 等. 4个马铃薯品种感染马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的症状 [J]. *植物保护*, 2014, 40(6): 159-163.
- [14] 崔荣昌, 李芝芳, 李晓龙, 等. 马铃薯纺锤块茎类病毒的检测和防治 [J]. *植物保护学报*, 1992(3): 263-269.
- [15] 何小源, 周广和, 刘艾生. 马铃薯纺锤块茎类病毒株系鉴定 [J]. *植物病理学报*, 1993, 23(4): 75-79.
- [16] Wassenegger M, Spieker R L, Thalmeir S, *et al.* A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum* [J]. *Virology*, 1996, 226(2): 191-197.
- [17] Qi Y, Ding B. Replication of potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation [J]. *Virology*, 2002, 302(2): 445-456.