



刘灿, 余尚真, 张雪晴, 冯晨露, 张文镐, 王金英, 谢印帅, 李涵伟, 程玉琴. 灰比诺葡萄病毒侵染性克隆构建及致病性[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(11):74-82.  
LIU Can, YU Shangzhen, ZHANG Xueqing, FENG Chenlu, ZHANG Wenhao, WANG Jinying, XIE Yinshuai, LI Hanwei, CHENG Yuqin. Construction and pathogenicity tests of one infectious clone of Grapevine Pinot gris virus[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(11):74-82.  
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.11.08

## 灰比诺葡萄病毒侵染性克隆构建及致病性

刘 灿<sup>1</sup> 余尚真<sup>1</sup> 张雪晴<sup>1</sup> 冯晨露<sup>1</sup> 张文镐<sup>1</sup> 王金英<sup>1</sup> 谢印帅<sup>1</sup>  
李涵伟<sup>1</sup> 程玉琴<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业大学 园艺学院, 北京 100193;  
2. 农业农村部葡萄酒加工重点实验室, 北京 100083)

**摘 要** 为探索灰比诺葡萄病毒(Grapevine Pinot gris virus, GPGV)在葡萄上的致病性,以感染GPGV山东分离物(GPGV-SD)的‘阳光玫瑰’葡萄植株为试材,利用RT-PCR扩增获得GPGV-SD的基因组全长序列并构建了该病毒的侵染性克隆,随后将其接种本生烟和葡萄植株进行致病性分析。结果表明:GPGV-SD基因组全长为7 274个核苷酸(不含poly(A)尾),与国内外已报道的GPGV分离物的核苷酸序列相似度为74.00%~96.90%。GPGV-SD能系统侵染本生烟,分别在接种后5和8 d检测到第1片系统叶和顶部叶中的GPGV,并在接种后约3周观察到本生烟系统叶出现褪绿斑症状。利用农杆菌介导的真空渗透法也可使GPGV-SD系统侵染葡萄植株,‘红地球’和‘马瑟兰’葡萄苗在接种GPGV-SD后未表现出明显的病毒病症状。本研究有助于拓宽对GPGV致病性的认识,所构建的GPGV-SD的侵染性克隆可作为葡萄病毒与寄主互作研究的工具。

**关键词** 葡萄灰比诺病毒; 侵染性克隆; 致病性; 本生烟; 葡萄

中图分类号 S432.41

文章编号 1007-4333(2024)11-0074-09

文献标志码 A

## Construction and pathogenicity tests of one infectious clone of Grapevine Pinot gris virus

LIU Can<sup>1</sup>, YU Shangzhen<sup>1</sup>, ZHANG Xueqing<sup>1</sup>, FENG Chenlu<sup>1</sup>, ZHANG Wenhao<sup>1</sup>,  
WANG Jinying<sup>1</sup>, XIE Yinshuai<sup>1</sup>, LI Hanwei<sup>1</sup>, CHENG Yuqin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China;  
2. Key Laboratory of Viticulture and Enology of Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

**Abstract** To explore the pathogenicity of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) on grapes, grapevine cultivar Shine Muscat plant infected with GPGV Shandong isolate (GPGV-SD) was taken as the study material. RT-PCR was used to amplify the complete genome sequence of GPGV-SD and an infectious cDNA clone of the virus was then constructed. The pathogenicity of GPGV-SD on *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants were also analyzed. The results indicated that: The genome of GPGV-SD was 7 274 nucleotides in length excluding the poly(A) tail, which shared 74.00% to 96.90% nucleotide sequence similarity with that of the previous reported isolates of GPGV. GPGV-SD could systemically infect *N. benthamiana* plants and the virus was detected in the first systemically infected and upper leaves at about 5 to 8 days after inoculation. In addition, the symptoms of chlorotic blotches and spots were observed in systemically infected leaves of *N. benthamiana* plants at about 3 weeks after inoculation. GPGV-SD was also able to systemically infect

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272646)

第一作者: 刘灿(ORCID: 0009-0003-1463-1997), 硕士研究生, E-mail: liucan2018305@163.com

通讯作者: 程玉琴(ORCID: 0000-0001-8151-2187), 教授, 主要从事果树病毒病防控及果树病毒与寄主的分子互作研究, E-mail: chengyuqin@cau.edu.cn

grapevine plants via vacuum-agroinfiltration method, and the inoculation of the ‘Marselan’ and ‘Red Globe’ grapevine plants with GPGV-SD did not induce obvious symptoms. In conclusion, this study can broaden our knowledge on the pathogenicity of GPGV-SD, and the infectious cDNA clone of GPGV-SD is a power tool for studying the interactions between grapevine viruses and hosts.

**Keywords** Grapevine Pinot gris virus; infectious clone; pathogenicity; *Nicotiana benthamiana*; *Vitis vinifera*

葡萄是感染病毒最多的果树,至今已发现有 90 多种病毒可侵染葡萄<sup>[1]</sup>。病毒病可导致葡萄产量平均减少 30%~80%,严重者甚至绝收;同时病毒病使葡萄果粒着色差且大小不等、可溶性固形物含量显著降低<sup>[2]</sup>。对葡萄生产危害最大的病毒病主要有葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease)、葡萄扇叶病(又称葡萄扇叶退化病, Grapevine fanleaf degeneration)、葡萄皱木复合病(Grapevine rugose wood complex)和葡萄叶斑驳畸形病(Grapevine leaf mottling and deformation, GLMD)等<sup>[1]</sup>。其中, GLMD 是 2012 年在意大利葡萄园中的‘灰比诺(Pinot gris)’葡萄品种上首次发现的<sup>[3]</sup>,目前,该病在世界各国葡萄园中均有广泛分布。发病葡萄植株叶片表现褪绿斑驳和严重畸形,枝条节间变短、植株矮小<sup>[3]</sup>。有研究表明,葡萄灰比诺病毒(Grapevine Pinot gris virus, GPGV)可能与该病相关<sup>[3-5]</sup>。

GPGV 为正单链 RNA 病毒,是乙型线形病毒科(*Betaflexiviridae*)毛发状病毒属(*Trichovirus*)的成员。该病毒基因组全长约 7 179~7 312 个核苷酸,含 3 个开放阅读框,分别编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)、移动蛋白(MP)和外壳蛋白(CP)。3'末端有 poly(A)尾。GPGV 在无症状和有叶斑驳畸形病症状的葡萄植株中均可被检测到<sup>[3]</sup>,而且通常与其他病毒一起复合侵染葡萄植株<sup>[4-5]</sup>。目前我们对 GPGV 致病性的认识还十分有限。

GLMD 近年来在我国扩展迅速,在‘阳光玫瑰’‘美人指’‘巨玫瑰’等许多葡萄主栽品种上普遍发生<sup>[5]</sup>。本研究通过 RT-PCR 扩增、5'和 3'RACE 获得 GPGV 山东分离物(GPGV-SD)基因组全长序列并构建了该病毒的侵染性 cDNA 克隆,随后在‘红地球’‘马瑟兰’葡萄苗和该病毒的试验寄主本生烟上进行了 GPGV-SD 侵染性和致病性分析,旨在加深对 GPGV 致病性的认识,并为葡萄的基因功能验证提供研究工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料、载体和菌株

感染了包括 GPGV 在内的多种病毒的‘阳光玫瑰’葡萄盆栽苗(将采自山东的休眠枝条经扦插繁育得到)、本生烟及经过农杆菌菌液浸润后移栽到土盆的‘红地球’‘马瑟兰’葡萄苗在养苗室中分区放置。在组培室中培养的‘红地球’‘马瑟兰’葡萄组培苗经脱毒处理后,不含葡萄卷叶伴随病毒 1 号(Grapevine leafroll-associated virus 1, GLRaV-1)、GLRaV-2、GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-7、GLRaV-13、葡萄斑点病毒(Grapevine fleck virus, GFkV)、葡萄扇叶病毒(Grapevine fanleaf virus, GFLV)、葡萄 A 病毒(Grapevine virus A, GVA)、GPGV、葡萄浆果内坏死病毒(Grapevine berry inner necrosis virus, GINV)、葡萄蚕豆萎蔫病毒(Grapevine fabavirus, GFabV)、葡萄双生病毒 A(Grapevine geminivirus A, GGVA)和沙地葡萄茎痘相关病毒(Grapevine rupestris stem pitting-associated virus, GRSPaV)。养苗室和组培室温度均为 25℃左右,光照 16 h,黑暗 8 h。

植物双元表达载体 pXT1 由南京农业大学陶小荣教授惠赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 由本实验室保存。GPGV CP 抗血清由本实验室制备保存。

### 1.2 试剂及引物

DNA marker、2×Taq PCR Master Mix 购自北京拓英坊科技有限公司,胶回收试剂盒、反转录试剂盒(HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、5'/3'RACE 扩增试剂盒(HiScript-TS 5'/3' RACE Kit)、拓朴克隆试剂盒(Ultra-Universal TOPO Cloning Kit)和质粒提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,高保真酶(KOD One TM PCR Master Mix)购自东洋纺(上海)生物科技有限公司, RNA 提取试剂盒(HiPure HP Plant RNA Mini Kit)购自广州美基生物科技有限公司, DNA 提

取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,同源重组酶(HiFi DNA Assembly Master Mix)购自NEW ENGLAND Biolabs公司。  
GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-7、GLRaV-13、GFkV、GFLV、GVA、GPGV、GINV、GGVA、GFabV和GRSPaV的检测引物和克隆GPGV全基因组引物见表1。本研究引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物信息  
Table 1 Primer information

| 引物<br>Primer | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequences(5'-3') | 基因<br>Gene               | 大小/bp<br>Size | 参考文献<br>Reference      |
|--------------|----------------------------------------|--------------------------|---------------|------------------------|
| F1           | GGTTGGGTAAGCCGTTGAGAGCTCT              | GLRaV-1 <i>HSP70</i>     | 637           | [6]                    |
| R1           | TAAGTTCCTCAGCACCTTCTACGA               |                          |               |                        |
| F2           | TTTGCGAAGAAAGAAATCGTTAAGATGAGG         | GLRaV-2 <i>p24</i>       | 711           | [5]                    |
| R2           | TACGTCAGGTAGATACACCCACGTTCTGA          |                          |               |                        |
| F3           | GCCCGCATCGATATGGACCTATCGTTTATT         | GLRaV-3 <i>p19.7</i>     | 540           | [5]                    |
| R3           | GCCGTGCACTTATAGTGCTCCGCAACAAA          |                          |               |                        |
| F4           | ACATTCTCCACCTTGTGCTTTT                 | GLRaV-4 <i>HSP70</i>     | 319           | [7]                    |
| R4           | CATACAAGCGAGTGCAATTACA                 |                          |               |                        |
| F5           | CGAAGGTTTGCTATACGTCAACCC               | GLRaV-7 <i>p61</i>       | 518           | [8]                    |
| R5           | TGAACAAGTGACGCCGACGA                   |                          |               |                        |
| F6           | ATCAGGTCGTGAACCAAGCAGG                 | GLRaV-13 <i>HSP70h</i>   | 253           | [9]                    |
| R6           | TAAGACCAGGTTTCGACCGTTGG                |                          |               |                        |
| F7           | CCWGACYTMTCYCTRCCAAG                   | GFLV <i>CP</i>           | 450           | [10]                   |
| R7           | GGYTTRCACAAACDCGGAG                    |                          |               |                        |
| F8           | ATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAGC               | GFkV <i>CP</i>           | 366           | [6]                    |
| R8           | CGGAGTCCTTGATGGTGGGGTTGA               |                          |               |                        |
| F9           | GACAAATGGCACACTACG                     | GVA <i>CP</i>            | 429           | [6]                    |
| R9           | AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG                 |                          |               |                        |
| F10          | AGGCGAATCAAGTACTTCATG                  | GPGV <i>CP</i>           | 340           | [6]                    |
| R10          | GGTGCTTCTTGATATATATTAGTATGC            |                          |               |                        |
| F11          | ATGTCGATMAGRCAGGAATTG                  | GINV <i>CP</i>           | 585           | [11]                   |
| R11          | CATAGTAAAAGCACCCCTCGCT                 |                          |               |                        |
| F12          | CGTCACTGCTCTGATGTTGGTAG                | GRSPaV <i>CP</i>         | 327           | [6]                    |
| R12          | AGGCGATATTAGCAACCATCTCAG               |                          |               |                        |
| F13          | GGAAATAACATTCCCAGGAAG                  | GFabV <i>polyprotein</i> | 313           | Designed in this study |
| R13          | TCCTGCTGTCAAATTTTCATTC                 |                          |               |                        |
| F14          | ATGGACTTCAATCCGAGAAAGAGG               | GGVA <i>V1</i>           | 685           | Designed in this study |
| R14          | GGCCTCCATACTTAATATCAGAGTAGG            |                          |               |                        |
| F15          | CCCCATGCTATCCTTCG                      | Grapevine <i>Actin</i>   | 216           | [6]                    |
| R15          | AGGCAGCTCATAGTTCTTCTC                  |                          |               |                        |
| F16          | CTTCCTACCTCAAGAAGGTAGG                 | Tobacco <i>Actin</i>     | 208           | Designed in this study |
| R16          | ATCTTGTAACATCCTGAAGTGG                 |                          |               |                        |
| F17          | TCATTTTAATTTTCGGATAAAGTTGGTAAAG        | GPGV complete genome     | 7 285         | Designed in this study |
| R17          | TGATCAATTGATCC                         |                          |               |                        |
|              | TTTTTTTTTTTGGAAAATTAATTAATAACA         |                          |               |                        |

### 1.3 RT-PCR 和 PCR 检测葡萄病毒

分别将本生烟叶片、葡萄叶片组织加液氮并研磨成粉末。将粉末转移到 2 mL 的 RNase-free 离心管中,分别按照 RNA 和 DNA 提取试剂盒的操作手册提取总 RNA 和总 DNA。随后将 RNA 反转录成 cDNA。根据反转录试剂盒(HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit)的使用说明进行操作。

检测 GGVA 时直接用 DNA 进行 PCR,检测其他病毒和克隆 GPGV-SD 全基因组均用 cDNA 为模板进行 PCR 反应。10  $\mu$ L 的 PCR 扩增体系包括 1  $\mu$ L cDNA 或 DNA、3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、正反向引物各 0.5  $\mu$ L (10  $\mu$ mol) 和 5  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Master Mix。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min、95  $^{\circ}$ C 变性 30 s、54~60  $^{\circ}$ C (根据引物 *T<sub>m</sub>* 值确定) 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 24~45 s (根据产物长度确定),35 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.4 蛋白质印迹(Western blot)

Western blot 检测 GPGV 按照文献[12]介绍方法操作。GPGV CP 抗血清的稀释倍数为 1:2 000,用 ECL 化学发光法检测杂交信号。

### 1.5 GPGV-SD 侵染性克隆构建、测序

将检测 GPGV CP 基因的 PCR 产物送公司测序,将测序结果(GPGV CP 基因部分序列 342 bp)在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行比对,发现与 GPGV 分离物 ERR922631(GenBank: BK011064)的 CP 基因序列相似度为 97.67%。因此,根据该分离物全序列设计引物 F17/R17(表 1)来扩增 GPGV-SD 全基因组。用拓扑克隆试剂盒将扩增产物连接 pCE3 Blunt Vector 并送公司进行 NGS 测序。保存测序结果正确的重组质粒(pCE-GPGV-SD)。为进一步确定 GPGV-SD 基因组 5' 和 3' 末端序列的正确性,用 5'/3'RACE 扩增试剂盒将葡萄总 RNA 反转录成 cDNA,参照上述 GPGV-SD 全序列设计 5'/3' 基因特异性引物(5' GSP: GGGACCAAATGCCCTATGTGACTGGAGG; 3' GSP: AGGAGAGAGCTGATCGCAAAGCTGAGCG)并扩增 GPGV-SD 的 5' 末端和 3' 末端序列,将扩增产物连接 pCE3 Blunt Vector 并送公司进行 Sanger 测序,获得正确的 GPGV-SD 末端序列。使用 MEGA7.0 软件,采用邻接法(Neighbor-Joining),自展校正值为 2 000,对 GPGV-SD 和选取的 GenBank 已报道的 19

个 GPGV 分离株进行系统进化树分析。

随后构建 GPGV-SD 侵染性克隆。首先,根据 GPGV-SD 全基因组和载体 pXT1 的序列信息设计引物 F (5'-3': TTAATTTTCAAAAAAAAAAAAA GGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCG)/R (5'-3': TTATCCGAAAATTAAAATGACC TCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATAT)。以二元表达载体 pXT1 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物即为线性化的 pXT1 全序列片段(片段两端末尾分别带有 GPGV-SD 的同源臂,其序列为引物划线部分)。以 pCE-GPGV-SD 为模板,用 F17/R17 进行 PCR 扩增得到 GPGV-SD 全基因序列。用同源重组酶 HiFi DNA Assembly Master Mix 将这 2 个片段进行拼接,获得 GPGV-SD 侵染性克隆(pXT-GPGV-SD)。

### 1.6 GPGV-SD 侵染性克隆在本生烟和葡萄上的致病性分析

将 pXT-GPGV-SD 用冻融法转化农杆菌菌株 GV3101,利用菌液 PCR 筛选获得阳性克隆。将含有 pXT-GPGV-SD 的农杆菌菌液在 YEP 液体培养基中(含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素、25  $\mu$ g/mL 利福平)经过 2 次摇菌(28  $^{\circ}$ C)至 OD<sub>600</sub> 值约为 1.0。收集菌体(6 000 r/min、5 min),随后用 MMA 缓冲液(10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L MES 和 150  $\mu$ mol/L AS)重悬菌液至 OD<sub>600</sub> 值为 1.0。菌液在浸润前于室温条件下静置 2 h。

生长 6 周左右的本生烟用于 GPGV-SD 的侵染试验。用 1 mL 一次性无菌注射器(无针头)将重悬菌液浸润到叶片背面,每片叶浸润 0.4 mL,每株烟草浸润 2 片叶。对浸润后的植株每天观察发病情况,并分别在浸润后 1 至 10 d 取第 1 片系统叶和顶部未展开叶为样品,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 GPGV。

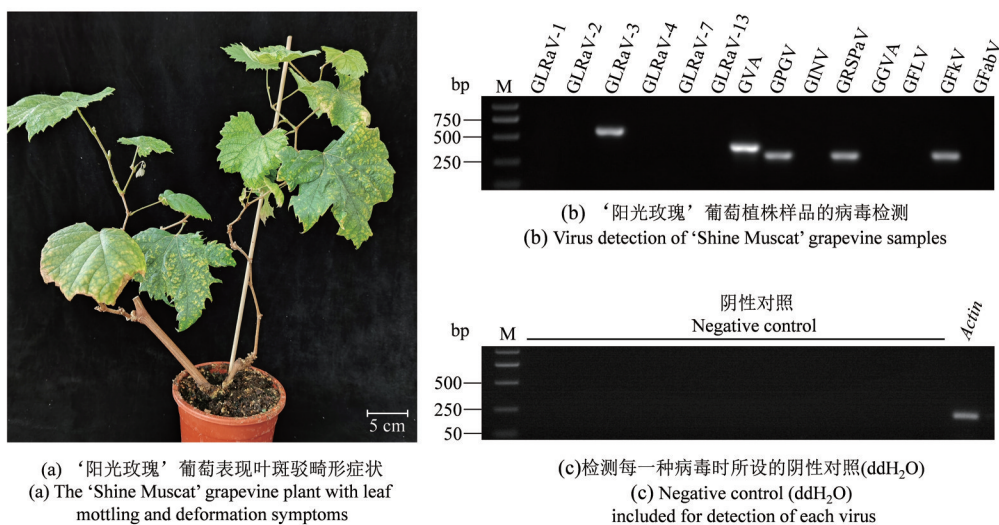
继代培养 4 周的‘红地球’‘马瑟兰’葡萄生根组培苗用于 GPGV-SD 的侵染试验。将组培苗从瓶中取出,用清水冲洗掉残剩的培养基。然后将组培苗浸没于含有 pXT-GPGV-SD 的农杆菌菌液中,按照文献[13]的操作方法用真空渗透法将农杆菌菌液浸润组培苗。把浸润后的组培苗用清水冲洗一下,将其移栽到土盆中。每天观察移栽葡萄植株的生长和发病情况,并在移栽 1 个月后采集葡萄叶片样品,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 GPGV。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆 GPGV-SD 全基因组序列

2023年1月,对采自山东烟台的‘阳光玫瑰’葡萄休眠枝条进行扦插繁殖时,发现成活的葡萄苗表现出叶斑驳畸形病症状(图1(a))。用 RT-PCR 和 PCR 对其进行了 GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-7、GLRaV-13、GFabV、GVA、GPGV、GFkV、GFLV、GINV、GGVA 和 GRSPaV 等 14 种重要葡萄病毒的检测,结果表明,该植株感染了 GLRaV-3、GVA、GPGV、GRSPaV 和 GFkV

这 5 种病毒(图 1(b)和(c))。随后用 RT-PCR 扩增‘阳光玫瑰’葡萄植株 GPGV 分离物(GPGV-SD)的全基因组,并通过 5'和 3'RACE 确定 GPGV-SD 基因组末端序列的正确性。GPGV-SD 基因组(GenBank: PP350831)全长为 7 274 nt(不含 poly(A)尾),与国内外已报道的 GPGV 分离物序列相似度在 74.00%~96.90%。系统进化树结果显示(图 2),GPGV-SD 与来自法国的 GPGV 分离物 PN(GenBank: KY706085)和来自意大利的 GPGV 分离物 fvg-Is12(GenBank: MH087443)亲缘关系最近,自展值(Bootstrap value)均达到了 100%。



M: DL 2 000 DNA marker; *Actin*: 内参基因。

M: DL 2 000 DNA marker; *Actin*: the internal reference gene.

图1 RT-PCR 和 PCR 检测‘阳光玫瑰’葡萄植株中的病毒

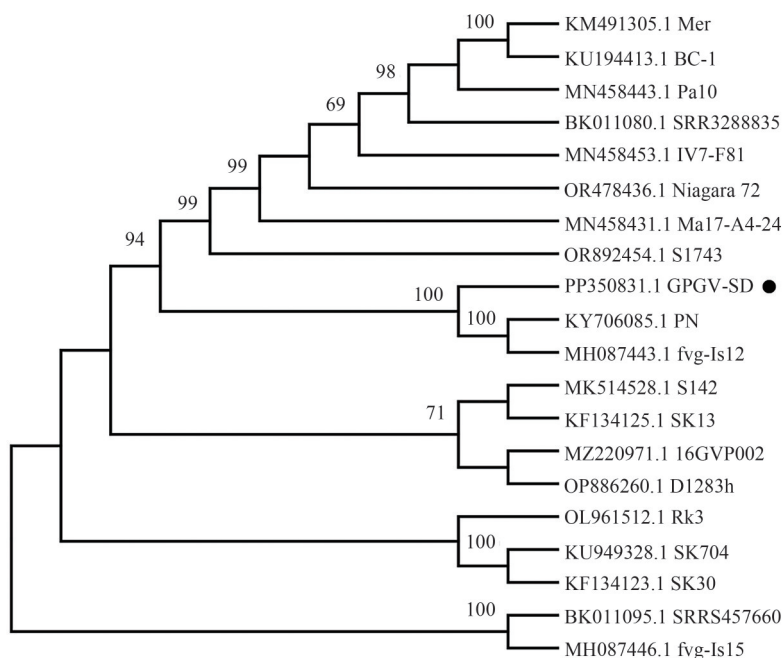
Fig. 1 RT-PCR and PCR detection of viruses in the ‘Shine Muscat’ grapevine plant

此外,GPGV-SD的3'末端存在着 poly(A)尾,但 3 次 RACE 试验得到的 poly(A)尾长度均不一样,分别为 11、8 和 17 个 A,这表明该病毒在葡萄植物体内存在 poly(A)长度变化的状况。本研究构建的 GPGV-SD 侵染性克隆含由 11 个 A 组成的 poly(A)尾。

### 2.2 GPGV-SD 在本生烟上的致病性

将 3'末端含 poly(A)尾(11 个 A)的 GPGV-SD 全长序列通过同源重组法构建了侵染性克隆 pXT-GPGV-SD。将携带 pXT-GPGV-SD 质粒的农杆菌菌液浸润本生烟,对照为浸润空载体 pXT1,各处理 16 株。在浸润后第 21 天,浸润 pXT-GPGV-SD 的本

生烟有 14 株成活,其中 12 株本生烟的系统叶出现褪绿斑症状,而浸润空质粒的本生烟均未出现症状(图 3(a))。抽取 3 株本生烟连续 9 d 进行 RT-PCR 检测,结果显示,在浸润 pXT-GPGV-SD 后的第 5 和第 8 天,分别在第 1 片系统叶和顶部未完全展开叶样品中检测到 GPGV 微弱条带(图 3(b)和(c))。Western blot 检测结果也显示,浸润后第 8 天,在接种植株第 1 片系统叶中可检测到明显的 GPGV CP 条带(图 3(d))。这些结果表明,本研究构建的 GPGV-SD 侵染性克隆可系统侵染试验寄主本生烟,在接种后 5~8 d,GPGV 就可从本生烟的浸润叶移动到全株,并在接种约 3 周后引起系统叶的褪绿斑症状。



数字为自展值,用于评估该分支的可信度;●表示 GPGV-SD。

The figures are bootstrap value and are used to assess the credibility of the branch; ● indicates GPGV-SD.

图 2 基于 GPGV-SD 和其他 19 个 GPGV 分离物核苷酸全序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the complete nucleotide sequence of GPGV-SD and 19 other GPGV isolate sequences

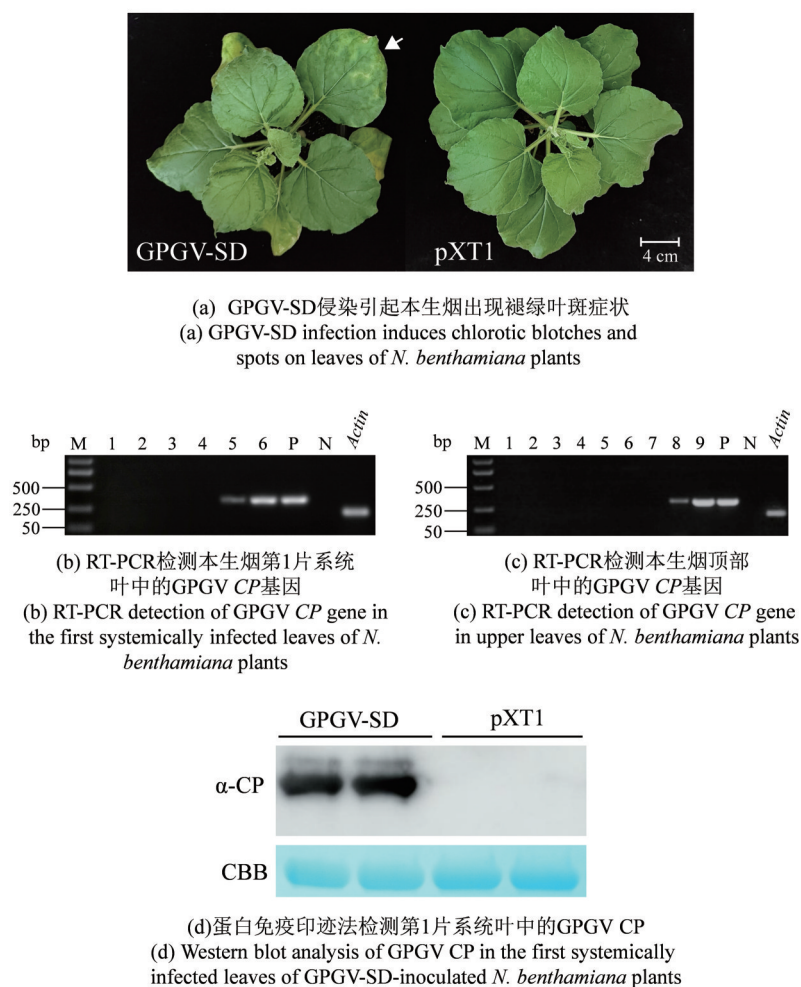
### 2.3 GPGV-SD 在‘红地球’‘马瑟兰’葡萄品种上的致病性

将携带 pXT-GPGV-SD 质粒的农杆菌菌液浸润‘红地球’‘马瑟兰’葡萄组培苗,对照为浸润空质粒 pXT1。移栽后 7~10 d 有新芽长出,表明移栽成活。移栽 1 个月后对葡萄苗取样进行病毒检测。20 株‘红地球’葡萄组培苗有 15 株(75%)在浸润 pXT-GPGV-SD 后存活,其中 9 株(60%)在一个月后经 RT-PCR 检测到 GPGV;20 株‘马瑟兰’葡萄组培苗有 14 株(70%)在浸润后存活,其中 8 株(57%)在一个月后经 RT-PCR 检测到 GPGV(图 4(b))。Western blot 也显示在浸润 pXT-GPGV-SD 的葡萄新叶中能检测到 GPGV 的 CP 条带(图 4(c))。‘红地球’‘马瑟兰’葡萄分别在移栽后约 100 和 60 d 内,均未表现出明显的病毒病症状(图 4(a))。说明本研究所构建的 GPGV-SD 侵染性克隆可系统侵染葡萄植株,且在本研究的试验条件下没有导致‘红地球’‘马瑟兰’葡萄品种出现明显的病毒病症状。

### 3 讨论

本研究以表现叶斑驳畸形病症状的‘阳光玫瑰’葡萄为材料,构建了 GPGV-SD 侵染性克隆,成功系

统侵染了本生烟并引起了褪绿斑症状,但未能在‘红地球’‘马瑟兰’葡萄上引起明显的病毒病症状。Targuini 等<sup>[14]</sup>报道 GPGV 分离物 fvg-Is12 和 fvg-Is15(GenBank: MH087443 和 MH087446)侵染本生烟引起严重黄化症状;在葡萄上则观察到叶斑驳畸形症状,不过在一段时间后该症状消失。GPGV-SD 与 GPGV 分离物 fvg-Is12 和 fvg-Is15 的核苷酸相似度分别为 96.13% 和 96.03%,核苷酸差异有可能是导致 GPGV-SD 致病性相对较弱的原因之一。Yu 等<sup>[5]</sup>和 Fan 等<sup>[15]</sup>的研究结果表明,在表现叶斑驳畸形病症状的葡萄植株中,除 GPGV 外,还经常检测到 GFabV、GRSPaV 和 GINV,这表明叶斑驳畸形病可能与多种病毒混合侵染有关。但是 Targuini 等<sup>[14]</sup>未对试验所用的灰比诺葡萄检测是否感染 GFabV、GRSPaV 和 GINV,而本研究所用的‘红地球’‘马瑟兰’葡萄苗不含 GPGV、GFabV、GRSPaV 和 GINV 等 14 种病毒。因此,这可能是 GPGV-SD 在‘红地球’‘马瑟兰’葡萄苗上未导致叶斑驳畸形症状的最主要原因。有报道表明,葡萄阿尔及利亚潜伏病毒(Grapevine Algerian latent virus)侵染性克隆可导致不同葡萄品种出现不同的症状<sup>[16]</sup>,而本研究与 Targuini 等<sup>[14]</sup>所用的葡萄品种不同。因此也不能排



pTX1: 浸润空载体pTX1的对照植株; 1~9: 分别在侵染后第1~9天采集的样品; P: 阳性对照(图1阳光玫瑰葡萄植株样品); N: 阴性对照(用ddH<sub>2</sub>O代替cDNA); M: DL 2 000 DNA marker;  $\alpha$ -CP: GPGV CP抗血清; CBB: 考马斯亮蓝色显示相同加样量; 箭头所指为褪绿斑症状。下同。

pTX1: Control plant agroinfiltrated with empty vector pTX1; Lanes 1-9: Samples collected at 1 to 9 days after agroinfiltration, respectively; P: Positive controls (samples from 'Shine Muscat' grapevine plant indicated in Fig. 1); N: Negative control (ddH<sub>2</sub>O instead of cDNA); M: DL 2 000 DNA marker;  $\alpha$ -CP: GPGV CP antiserum; CBB: Coomassie brilliant blue staining indicates equal loading; Arrows indicates the symptoms of chlorotic blotches and spots. The same below.

图3 GPGV-SD 侵染性克隆在本生烟的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of GPGV-SD in *Nicotiana benthamiana* plants

除因品种差异而造成GPGV-SD未在葡萄上导致症状的可能性。在后续的研究中需要在更多的葡萄品种苗上分析GPGV-SD的致病性。

此外,一些植物RNA病毒的基因组3'末端含poly(A)尾,且poly(A)尾长度可能与病毒侵染及病毒病症状形成具有密切的相关性<sup>[17-18]</sup>。GPGV-SD基因组的3'末端也含poly(A)尾,且poly(A)的长度至少有3种,即8、11和17个A。本研究构建的侵染性克隆中,GPGV-SD基因组3'末端的poly(A)尾长度为11。而Targuini等<sup>[14]</sup>未说明能引起叶斑驳畸形

病的GPGV侵染性克隆是否含poly(A)尾。下一步需要构建含不同poly(A)尾长度的GPGV-SD侵染性克隆来进一步分析其在葡萄上的致病性。

目前对葡萄等木本植物接种病毒的方法主要有农杆菌真空渗透法<sup>[13]</sup>和农杆菌浸泡法<sup>[19]</sup>。由于后一种方法不仅操作繁琐,且需要超过20 d才能完成病毒侵染过程,因此本研究利用农杆菌真空渗透法对葡萄组培苗接种GPGV-SD。但本研究发现该方法的操作也比较复杂而费时,且葡萄组培苗的移栽成活率(约70%)和病毒侵染率(约60%)也相对

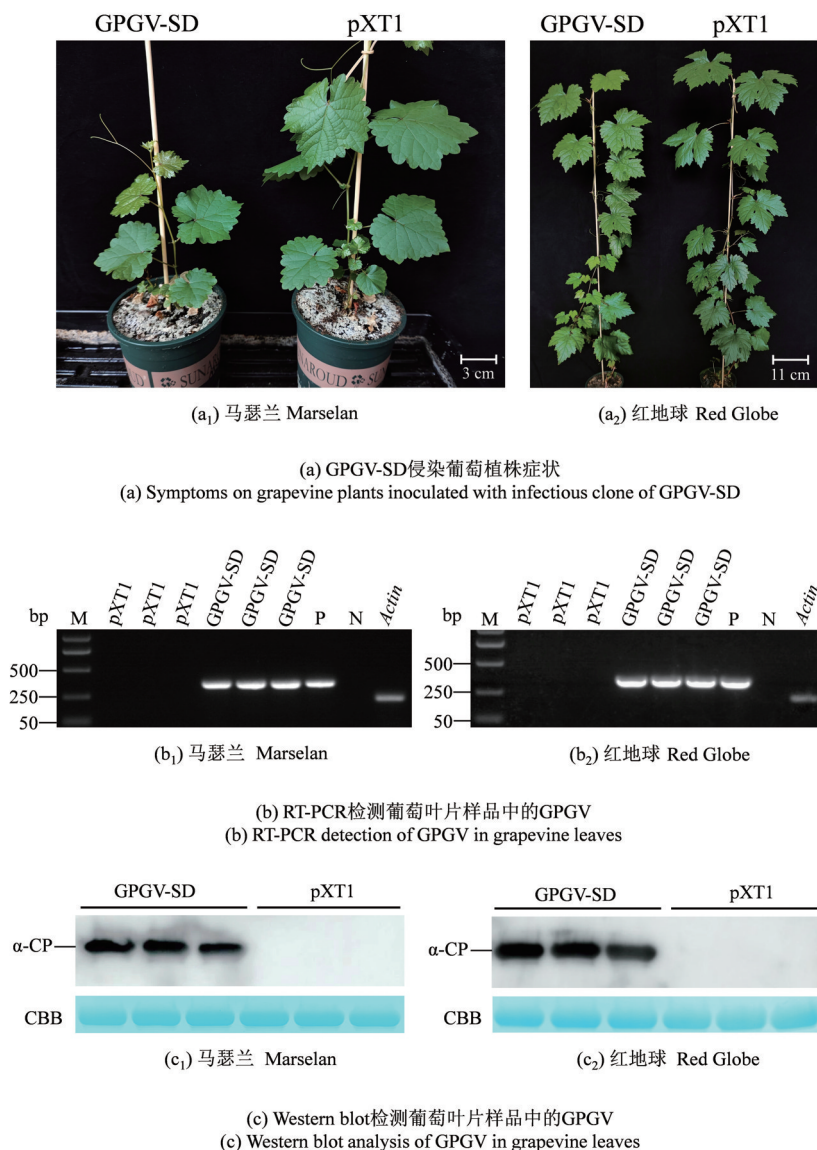


图 4 GPGV-SD 侵染性克隆在葡萄上的致病性  
Fig. 4 Pathogenicity of GPGV-SD in grapevine plants

较低。如何用简单高效的方法将病毒侵染性克隆接种到葡萄等果树植物,是下一步要解决的问题。

#### 4 结 论

本研究成功构建了 GPGV-SD 的侵染性克隆,能系统侵染本生烟和葡萄,在本生烟上引起系统叶的褪绿斑症状,但在‘马瑟兰’‘红地球’葡萄上没有导致明显病毒病症状。

#### 参考文献 References

[1] Fuchs M. Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple

but overall poorly adopted management solutions in the vineyard [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102(3): 643-653

[2] Song Y S, Hanner R H, Meng B Z. Probing into the effects of grapevine leafroll-associated viruses on the physiology, fruit quality and gene expression of grapes[J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 593

[3] Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R, Malossini U, Yoshikawa N, La Notte P, Terlizzi F, Credi R, Saldarelli P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris[J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 262-268

[4] 范旭东,董雅凤,张尊平,张梦妍,任芳,胡国君. ‘阳光玫瑰’葡萄病毒小 RNA 测序鉴定及 RT-PCR 检测[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(6): 749-755

Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, Zhang M Y, Ren F, Hu G J. Small RNA sequencing and RT-PCR detection of viruses infecting ‘Shine Muscat’ grapevines [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(6): 749-755 (in Chinese)

- [5] Yu S Z, Kan Q, Huang H Q, Wang J Y, Xie Y S, Li H W, Zhang X Q, Liu C, Cheng Y Q. Grapevine cultivar Shine Muscat in China: Occurrence of viruses and attempts to produce certified propagation material[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2023, 105(4): 1609-1616
- [6] Wang X Y, Zhang C W, Huang W T, Yue J, Dou J J, Wang L Y, Wang Q, Cheng Y Q. Crude garlic extract significantly inhibits replication of grapevine viruses[J]. *Plant Pathology*, 2020, 69(1): 149-158
- [7] Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 141(1): 22-29
- [8] Lv M D, Li X M, Guo R, Li M J, Liu X M, Wang Q, Cheng Y Q. Prevalence and distribution of grapevine leafroll-associated virus 7 in China detected by an improved reverse transcription polymerase chain reaction assay[J]. *Plant Pathology*, 2014, 63(5): 1168-1176
- [9] Ito T, Nakaune R. Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(9): 2555-2559
- [10] Zhou J, Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, Ren F, Hu G J. Detection and genetic variation analysis of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates in China[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(11): 2661-2667
- [11] 范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 张梦妍, 李晨, 张宝东, 董雅凤. 葡萄浆果内坏死病毒感染的‘贝达’葡萄 cDNA 文库构建及其利用[J]. *植物病理学报*, 2021, 51(2): 210-216
- Fan X D, Zhang Z P, Ren F, Hu G J, Zhang M Y, Li C, Zhang B D, Dong Y F. Construction and screening of a yeast two-hybrid cDNA library from Beta grapevine infected by grapevine berry inner necrosis virus [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2021, 51(2): 210-216 (in Chinese)
- [12] Zhang C W, Wang X Y, Li H W, Wang J Y, Zeng Q, Huang W T, Huang H Q, Xie Y S, Yu S Z, Kan Q, Wang Q, Cheng Y Q. GLRaV-2 protein p24 suppresses host defenses by interaction with a RAV transcription factor from grapevine[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(3): 1848-1865
- [13] Kurth E G, Peremyslov V V, Prokhnevsky A I, Kasschau K D, Miller M, Carrington J C, Dolja V V. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(11): 6002-6009
- [14] Tarquini G, Zaina G, Ermacora P, de Amicis F, Franco-Orozco B, Loi N, Martini M, Bianchi G L, Pagliari L, Firrao G, de Paoli E, Musetti R. Agroinoculation of grapevine Pinot gris virus in tobacco and grapevine provides insights on viral pathogenesis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0214010
- [15] Fan X D, Zhang Z P, Ren F, Hu G J, Li C, Zhang B D, Dong Y F. Development of a full-length infectious cDNA clone of the grapevine berry inner necrosis virus[J]. *Plants*, 2020, 9(10): 1340
- [16] Lovato A, Faoro F, Gambino G, Maffi D, Bracale M, Polverari A, Santi L C. Construction of a synthetic infectious cDNA clone of Grapevine Algerian latent virus (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 186
- [17] Niu S N, Cao S S, Huang L J, Tan K C L, Wong S M. The length of an internal poly(A) tract of hibiscus latent Singapore virus is crucial for its replication[J]. *Virology*, 2015, 474: 52-64
- [18] Guo S, Kierzek E, Chen G, Zhou Y J, Wong S M. TMV mutants with poly(A) tracts of different lengths demonstrate structural variations in 3'UTR affecting viral RNAs accumulation and symptom expression[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18412
- [19] Muruganantham M, Moskovitz Y, Haviv S, Horesh T, Fenigstein A, Preez J D, Stephan D, Burger J T, Mawassi M. Grapevine virus A-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 155(2): 167-174

责任编辑: 董金波



**第一作者简介:** 刘灿, 中共党员, 硕士研究生。本科就读于华中农业大学园艺专业, 期间获得校级三好学生奖学金4次和优秀毕业生。2022年9月至今就读于中国农业大学果树学专业, 期间获得学业二等奖学金、校级崇德先锋奖学金和校级优秀学生干部称号。



**通讯作者简介:** 程玉琴, 中国农业大学园艺学院果树系教授, 研究方向为果树病毒与寄主植物的分子互作及果树病毒病防控。主持国家自然科学基金面上项目3项和横向课题多项, 并参与国家重点研发和农业农村部转基因生物新品种培育重大专项等多个项目。以通讯作者或第一作者身份在 *Plant Physiology*、*Molecular Plant Pathology*、*Plant Disease*、*Journal of General Virology*、*Plant Physiology and Biochemistry*、*Viruses*、*Virus Research* 和 *Plant Pathology* 等国际期刊上发表多篇研究论文。