

河南甜樱桃病毒病害调查及病原检测

刘聪利, 李明*, 赵改荣, 李玉红

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要 在河南省郑州市、巩义市、荥阳市、新郑市选择具有代表性的甜樱桃生产园对病毒病发生情况进行调查, 采集表现为疑似病毒病症状的样本 65 份, 利用 7 种病毒引物进行 RT-PCR 检测。5 种病毒检测结果呈阳性, 分别是李属坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)、李矮缩病毒(*Prune dwarf virus*, PDV)、樱桃绿环斑驳病毒(*Cherry green ring mottle virus*, CGRMV)、樱桃坏死锈斑病毒(*Cherry necrotic rusty mottle virus*, CNRMV)及樱桃病毒 A(*Cherry virus A*, CVA); 序列分析结果表明, 5 种病毒扩增片段与 GenBank 中注册的相应病毒核苷酸序列均具有较高的一致性; 样本病毒检出率为 100%, 其中 13 份样本为单独侵染, 其余 52 份样本均为多病毒复合侵染, 占比高达 80%, 复合侵染比例随着侵染病毒种类的增多逐渐降低; 病毒侵染组合与叶片表型症状无明显对应关系。

关键词 甜樱桃; 病毒病; 病原检测; 复合侵染

中图分类号: S 436.629 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.04.034

Investigation and pathogen detection of sweet cherry virus disease in Henan

Liu Congli, Li Ming, Zhao Gairong, Li Yuhong

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract Several representative sweet cherry orchards were selected to investigate the occurrence condition of virus disease in Zhengzhou, Gongyi, Xingyang and Xinzheng cities of Henan Province, from which sixty-five samples with suspected virus symptoms were collected. Seven pairs of specific primers were used to detect viruses infected sweet cherry by RT-PCR. RT-PCR results and sequence analysis showed that five viruses were found positive, including *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry virus A* (CVA). The amplified fragments had high identity with the corresponding nucleotide sequence reported in GenBank. The positive rate of viruses was 100%, among all 65 samples tested, 13 were of single infection, and the rest 52 samples were of mixed infection which account for more than 80%. The proportion of mixed infection gradually decreased along with ascending of the virus types. No significantly comparable relations were found between types of mixed infection and virus disease symptoms.

Key words sweet cherry; virus disease; pathogen detection; mixed infection

甜樱桃种植业历来享有“黄金种植业”的美誉, 近年来甜樱桃栽培面积和总产量均稳定增长。截至 2013 年, 我国甜樱桃栽培面积已达 13.48 万 hm^2 , 较 2001 年增加了近 10 倍^[1]。随着甜樱桃栽培规模不断扩大, 其病毒病的危害在生产中亦逐年显现, 已逐步成为影响甜樱桃产量和品质的关键因素之一。

目前已知侵染甜樱桃的病毒约 34 种, 较常见的有 20 种^[2]。王文文等^[3]、卢美光等^[4]先后对环渤海湾地区和北京的樱桃病毒病发生情况进行了调查和

鉴定, 初步明确了我国甜樱桃主产区病毒病原主要有: 李属坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)、李矮缩病毒(*Prune dwarf virus*, PDV)、樱桃绿环斑驳病毒(*Cherry green ring mottle virus*, CGRMV)、樱桃坏死锈斑病毒(*Cherry necrotic rusty mottle virus*, CNRMV)、樱桃病毒 A(*Cherry virus A*, CVA)、苹果褪绿叶病毒(*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)及樱桃小果病毒(*Little cherry virus*, LChV)。宗晓娟等^[5]建立和完

收稿日期: 2015-08-24 修订日期: 2015-10-10

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项经费(CAAS-ASTIP-2015-ZFRI); 郑州市现代农业科技创新工程(131PZDGC113)

* 通信作者 E-mail: limingzhengzhou@hotmail.com

善了几种主要病毒的单重 RT-PCR、多重 RT-PCR、纳米磁珠技术结合多重 RT-PCR 的检测方法,为高效、准确检测甜樱桃病毒病原提供了技术保证。尽管目前侵染甜樱桃的病毒种类已初步明确,其相关病毒检测技术也逐步健全,但关于我国甜樱桃病毒病的危害特点尚未有系统报道,尤其是侵染甜樱桃的病毒中,单独侵染或多病毒复合侵染的比例,以及多病毒复合侵染的类型尚不明晰。本研究利用单重 RT-PCR 技术,对来源于河南、辽宁、山东、陕西等地的甜樱桃生产园中表现疑似病毒病症状的苗木样本进行病原检测,以期明确我国甜樱桃病毒病的危害特点,为甜樱桃病毒病诊断和病原检测提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2013 年 4 月—6 月,在河南省郑州市、巩义市、荥阳市、新郑市选择具有代表性的甜樱桃生产园进行病毒病害分布调查并采集样本。采样果园为成龄园或老龄园,所选苗木分别来源于河南、陕西、大连、山东等地。共采集表现疑似病毒病症状的样本 65 份,每株树作为 1 份样本,每份样本采集病叶 5 片,记录症状并拍照保存。随后将样本密封

(塑料自封袋),编号后放入液氮罐,带回实验室保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

采用生物工程(上海)股份有限公司的柱式植物总 RNA 提取纯化试剂盒提取总 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。采用 Fermentas 公司的 First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录获得 cDNA 第一链。取上述 RNA 5 μg , 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 随机引物 1 μL ,加适量 ddH₂O 至 12 μL ,70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min 后置于冰上冷却,依次加入 20 U/ μL RNA 酶抑制剂 1 μL 、10 mmol/L dNTPs 2 μL 、5 \times 反转录缓冲液 4 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min,加入 200 U/ μL 反转录酶 1 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h,70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,终止反应后离心,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,即为 cDNA 模板,稀释 8 倍后用于 PCR 扩增。

1.3 PCR 扩增和目的片段克隆

选用国内外已报道的李属坏死环斑病毒(PNRSV)、李矮缩病毒(PDV)、苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)、樱桃坏死锈斑病毒(CNRMV)、樱桃病毒 A (CVA)、樱桃绿环斑驳病毒(CGRMV)、樱桃小果病毒 2(LChV2)特异引物^[6-9](表 1)进行 RT-PCR 扩增。从 65 个样本中优先挑选 5 个病毒危害症状较为严重的样本进行检测。

表 1 7 种病毒 RT-PCR 检测特异性引物

Table 1 Specific primers for detection of seven viruses by RT-PCR

病毒 Virus	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段长度/ bp Product size	参考文献 Reference
PNRSV	PNRSV-F	ACGCGAAAAGTGTGCGAAATCTAAA	449	[6]
	PNRSV-R	TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAAG		
PDV	PDV-F	TAGTGCAGGTTAACCAAAAAGGAT	172	[6]
	PDV-R	ATGGATGGGATGGATAAAAATAGT		
LChV2	LChV2-F	TCCGAATAGTCAGTTCAAAG	337	[7]
	LChV2-R	AATAGCCCTCATAAATCTCC		
CGRMV	CGRMV-F	CCTCATTACATAGCTTAGGTTT	958	[8]
	CGRMV-R	ACTTTAGCTTCGCCCGTG		
CNRMV	CNRMV-F	TCCCACCTCAAGTCTTAGCAG	584	[9]
	CNRMV-R	TGAACTTGCCAGTTCTGCC		
ACLSV	ACLSV-F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	309	[9]
	ACLSV-R	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA		
CVA	CVA-F	AGCCAGAAGGTATCATGCCAG	566	[9]
	CVA-R	ATGACATGCTGCTGGGAG		

0.2 mL PCR 管中依次加入 cDNA 1 μL ,dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL ,10 \times PCR buffer (含 Mg²⁺) 2 μL ,Pfu DNA 聚合酶(5U/ μL) 0.2 μL ,上游和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL ,加 dd H₂O 补足 20

μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,63 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,DL2000 分子量标准指示病毒特异性扩增片段,紫外

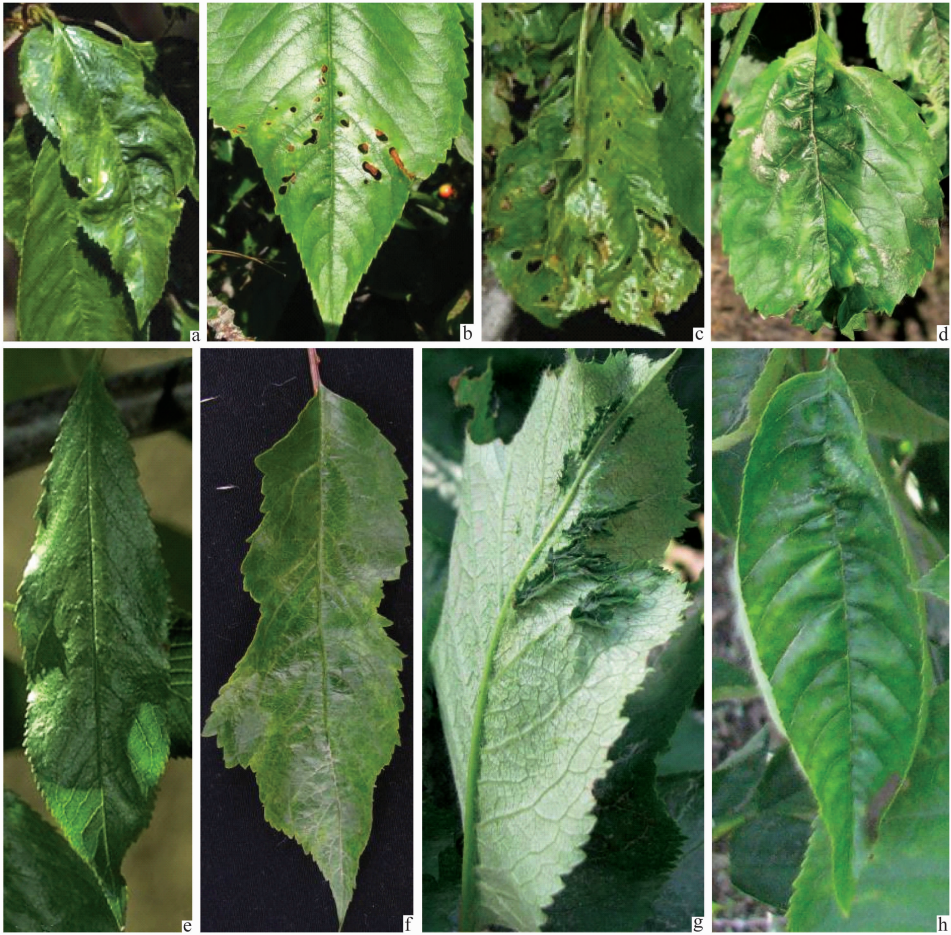
灯下观察电泳结果并照相记录。

电泳结束后在紫外透射仪上分别切下相应条带,采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。将纯化后的 PCR 产物连接到 pGEM-Easy 载体上,转化 DH5 α 感受态细胞,经菌落 PCR 筛选阳性克隆,提取质粒,选取 2~3 个阳性克隆送公司测序,所得到的序列与 GenBank 中注册的序列进行比对。以经过上述过程验证的包含病毒目标片段的重组质粒作为 RT-PCR 检测的阳性对照, ddH $_2$ O 作为阴性对照,对其余样本进行 RT-PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃病毒病的危害调查

对 4 个甜樱桃生产园中的病毒病症状进行观察,结果表明,各果园均有表现病毒病症状的植株,主要症状为叶片皱缩、黄化花叶、坏死环斑、浓绿细长、畸形、边缘缺损、叶背耳突、植株矮缩等(图 1)。其中早熟品种‘红灯’最为敏感,感染严重的植株只开花不结果。调查发现,大部分感病植株只是部分叶片表现症状,其开花结果没有受到严重影响。



a: 皱缩, 畸形; b: 坏死环斑; c: 畸形, 坏死环斑; d: 皱缩, 花叶; e: 浓绿, 细长; f: 边缘缺损; g: 耳突; h: 卷叶, 皱缩
a: Crinkle, deformity; b: Necrotic ringspot; c: Deformity, necrotic ringspot; d: Crinkle, mosaic; e: Leaves in dark green and slender; f: Defect on the edge; g: Enation; h: Leaf roll, crinkle

图 1 甜樱桃病毒病树的症状表现

Fig. 1 Symptoms of virus disease in sweet cherry

2.2 甜樱桃病毒病原 RT-PCR 检测结果分析

利用 7 种病毒的特异性引物对 65 份样本进行 RT-PCR 扩增,将检测结果进行统计,结果如图 2 所示,7 种待检病毒中 5 种病毒检测结果呈阳性,其检出率分别为 PNRSV 46.2%、PDV 60%、CGRMV

43.1%、CVA 73.8%、CNRMV 27.7%。

本研究所选样本皆为生产园中树龄较大、叶片表现明显病毒症状的样本,样本病毒检出率为 100%,其中,单一病毒侵染的有 13 份样本,其余 52 份样本均为多病毒复合感染,占比为 80%。多病毒

复合侵染中,PDV 和 CVA 复合侵染比例最高,达 21.2%;复合侵染病毒种类为 2、3、4、5 种不等,侵染比例分别为 42.3%、30.8%、23.1%、3.8%,随着复合侵染病毒种类的增多而降低(表 2)。病毒侵染组合与叶片症状表型无明显对应关系,如叶片表现环

死环斑症状的植株,感染病毒组合类型包括 PNRSV、CNRMV、CVA 3 种病毒或 PNRSV、PDV、CNRMV、CVA 4 种病毒;而同样感染 PNRSV、PDV、CVA 3 种病毒的植株则呈现叶片细长、浓绿或叶片褪绿斑驳的表型。

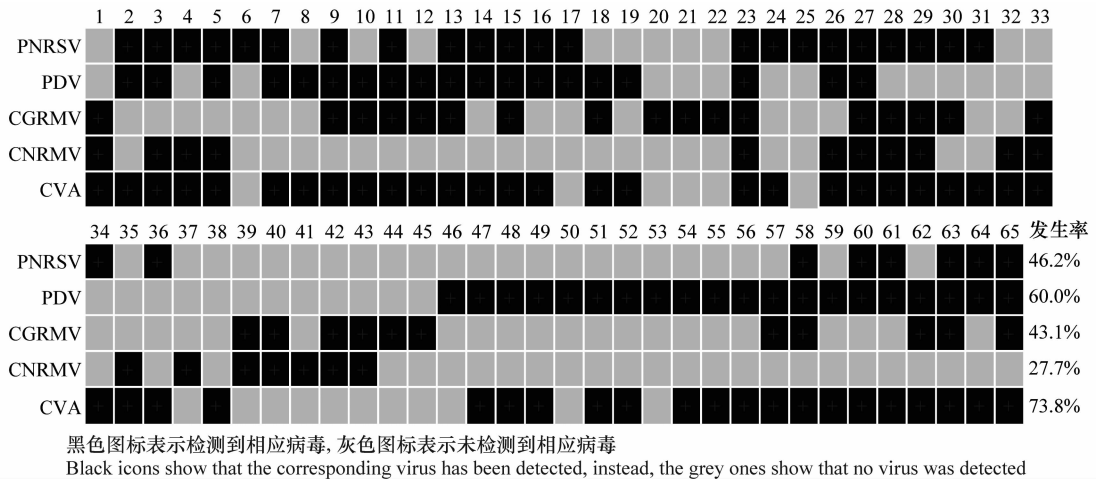


图 2 5 种甜樱桃病毒的发生情况统计图

Fig. 2 Statistical graph of the occurrence condition of five viruses infected sweet cherry

表 2 52 份复合侵染的甜樱桃样本中病毒的类型及比例¹⁾

Table 2 Co-infection types and virus percentage of each type in 52 samples

复合侵染病毒 数量/种 Co-infection numbers	病毒名称 Virus					复合侵染 Mixed infection	
	PNRSV	PDV	CGRMV	CNRMV	CVA	样本数量/株 Number of sweet cherry trees	比例/% Percentage
2	—	+	—	—	+	11	21.2
	—	—	—	+	+	2	3.8
	+	—	—	+	—	4	7.7
	—	—	+	+	—	4	7.7
	+	+	—	—	—	1	1.9
3	+	+	—	—	+	7	13.5
	+	—	—	+	+	1	1.9
	—	+	+	—	+	5	9.6
	+	—	+	—	+	1	1.9
	—	—	+	+	+	2	3.8
4	+	—	+	+	+	2	3.8
	+	+	—	+	+	3	5.8
	+	+	+	—	+	7	13.5
5	+	+	+	+	+	2	3.8

1) “+”表示检测到相应病毒;“—”表示未检测到相应病毒;“比例”=每种复合侵染类型的样本数量/52。

“+”indicates the corresponding virus that has been detected; “—” indicates that no virus was detected; “Percentage”=The number of sweet cherry trees for each co-infection/52.

2.3 甜樱桃病毒 RT-PCR 扩增片段序列分析

为进一步验证检测的准确性,将上述 5 种病毒的 PCR 产物进行克隆、测序,获得序列与 GenBank 中各病毒基因组序列相应区段比对,结果表明:PNRSV、PDV、CGRMV、CVA 和 CNRMV 与已知

序列相似性较高,为 78%~99%。

3 讨论

在长期的无性繁殖过程中,甜樱桃苗木感染并积累了多种病毒或类病毒^[9-10],一旦被病毒侵染,树

体终身带毒,致使树势减弱,产量降低,果实品质下降,甚至整株死亡。统计资料显示,1992—2007年地中海地区 24 000 株核果类果树的病毒病发病率高达 23.5%,其中樱桃感病率最高,达 45.6%,其复合侵染比例则高达 76.4%^[11]。王文文等^[12]通过对表现皱叶病的甜樱桃品种‘红灯’树体内的病毒检测后,发现多病毒复合侵染比例较高。本研究中,对表现疑似病毒病症状的 65 份样本的病原检测结果显示,样本病毒检出率为 100%,5 种病毒检测结果呈阳性,分别为 PNRSV、PDV、CGRMV、CVA、CNRMV,多病毒复合侵染比例高达 80%,与地中海地区樱桃病毒复合侵染比例 76.4% 差别不大^[11]。复合侵染病毒种类为 2、3、4、5 种不等,侵染比例随复合侵染病毒种类增多而降低。甜樱桃病毒侵染组合与叶片症状表型无明显对应关系,这一结论与王文文等^[12]对表现皱叶病的‘红灯’树体内病毒检测结果一致。

目前我国樱桃病毒病发生较为普遍,且复合侵染比例较高,虽然研究中涉及的样品数量及分布地点有限,但这些数据基本反映了我国樱桃病毒病的发生特点,可为后续调查提供数据支持。由于甜樱桃复合侵染病毒组合与叶片症状表型无明显对应关系,因此建立高效准确的检测方法,明确侵染甜樱桃的病毒种类,才能有针对性地控制病毒的传播。而选育抗病性强的优良品种、建立无病毒苗木繁育体系,是保证甜樱桃产量和提高品质的基本措施。

参考文献

- [1] 黄贞光,刘聪利,李明,等. 近 20 年国内外甜樱桃产业发展动态及对未来的预测[J]. 果树学报, 2014, 31(S1):1-6.
- [2] 董薇,宋雅坤,吴明勤,等. 大樱桃病毒病研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 332-336.
- [3] 王文文,宗晓娟,王甲威,等. 环渤海湾地区甜樱桃小果病毒及樱桃病毒 A 的鉴定与调查[J]. 植物保护, 2013, 39(2):128-133.
- [4] 卢美光,吴冰,高蕊,等. 我国部分地区樱桃病毒病害初步调查和病原检测[J]. 植物保护, 2015, 41(1):98-103.
- [5] 宗晓娟,王文文,王甲威,等. 甜樱桃病毒病分子检测技术的研究[J]. 果树学报, 2014, 31(S1):164-168.
- [6] 侯义龙,张开春,杨俊玲. 应用 RT-PCR 方法检测桃和樱桃及其组培苗上的 PNRSV 和 PDV[J]. 果树学报, 2005, 22(3):292-293.
- [7] 宗晓娟,王文文,魏海蓉,等. 3 种甜樱桃病毒 PNRSV、PDV 及 LChV-2 的多重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学, 2014, 47(6):1111-1118.
- [8] Li Ruhui, Mock R. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 129(2): 162-169.
- [9] Osman F, Al Rwahnih M, Golino D, et al. Evaluation of the phytosanitary status of the *Prunus* species in the national clonal germplasm repository in California; Survey of viruses and viroids [J]. Journal of Plant Pathology, 2012, 94(1): 249-253.
- [10] Kaponi M, Luigi M, Kyriakopoulou P E. Mixed infections of pome and stone fruit viroids in cultivated and wild trees in Greece [J]. New Disease Reports, 2012, 26(8): 8.
- [11] Pallas V, Aparicio F, Herranz M C, et al. Ilarviruses of *Prunus* spp: A continued concern for fruit trees [J]. Phytopathology, 2012, 102(12):1108-1120.
- [12] 王文文,宗晓娟,魏海蓉,等. 不同砧木甜樱桃品种‘红灯’皱叶病树体内的病毒检测[J]. 果树学报, 2014, 31(S1):159-163.

(责任编辑:杨明丽)