

葡萄病毒 A 实时荧光定量 RT-PCR 检测技术的建立及应用

任芳, 董雅凤*, 张尊平, 范旭东, 胡国君

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

摘要: 根据文献报道和 GenBank 已登录序列设计引物建立了葡萄病毒 A (*Grapevine virus A*, GVA) SYBR Green I 染料法实时荧光定量 RT-PCR 检测技术体系。该技术标准曲线循环阈值与模板浓度呈现良好线性关系, 扩增效率为 99.2%, 决定系数为 0.999, 可特异性检测 GVA, 灵敏度高 (达常规 RT-PCR 的 100 倍), 重复性好。对不同季节、不同品种以及不同部位葡萄样品 (嫩叶、嫩叶柄、老叶、老叶柄、卷须和休眠枝条) 中 GVA 的检出率普遍高于常规 RT-PCR。不同季节间比较, 对秋、冬季样品检测效果最好, 除嫩叶外其余部位检出率均达 100%, 春夏季检出率为 10% ~ 100%。不同部位间比较, 老叶柄和休眠枝条检测效果最好, 检出率均达 100%, 其次为老叶 (80% ~ 100%), 其余部位样品检出率为 10% ~ 100%。在大量田间样品检测中, 休眠枝条样品检测结果与常规 RT-PCR 一致, 而秋季老叶柄样品检出率明显高于常规 RT-PCR。

关键词: 葡萄; 葡萄病毒 A; 检测; 实时荧光定量 RT-PCR; 常规 RT-PCR

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 11-2243-11

Development and Application of a Quantitative RT-PCR Approach for Detection of *Grapevine virus A*

REN Fang, DONG Yafeng*, ZHANG Zunping, FAN Xudong, and HU Guojun*

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Trees, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: To develop a rapid and highly sensitive method for *Grapevine virus A* (GVA) detection, a SYBR Green I real time fluorescence quantitative RT-PCR method (RT-qPCR) was established, and an excellent linear correlation ($R^2 = 0.999$) and a high amplification efficiency ($E = 99.2\%$) were obtained from standard curve of cDNA. The RT-qPCR method could be used to detect GVA specifically, and the sensitivity was 100-fold higher than conventional RT-PCR. Reproducibility test revealed that the coefficients of variation in the intra- and extra- assay were 0.16% - 0.31% and 2.91%, respectively, indicating a good reproducibility. The RT-qPCR method could be used to detect a wide range of sample types, and the detection rates of samples from different seasons, cultivars and positions (young leaves, young petioles, old leaves, old petioles, tendrils and dormant branches) were generally higher than

收稿日期: 2018-05-02; **修回日期:** 2018-11-09

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-29-bc-1)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfdong@163.com)

conventional RT-PCR. Comparison of the detection rates of samples in different seasons showed that samples in autumn and winter were best for detection, and except for young leaves, the detection rates of all samples in these two seasons were all 100%. The detection rates of samples in spring and summer were 10% to 100%. Comparison of the detection rates of samples in different positions showed that samples of old petioles and dormant branches were best for detection, for which the detection rates were all 100%. The detection rate for old leaves was 80% to 100%, and for samples from other positions was from 10% to 100%. In detection of field samples, the results of dormant branches were most consistent with conventional RT-PCR, but the detection rate of old tendrils in autumn by RT-qPCR was obviously higher than that by conventional RT-PCR.

Keywords: grapevine; *Grapevine virus A*; detection; real-time fluorescent quantitative RT-PCR; conventional RT-PCR

葡萄皱木复合病 (Rugose wood complex, RW) 是葡萄上的一类重要病害, 发生普遍, 可造成葡萄嫁接成活率下降、春季萌芽延迟、生长减弱甚至衰退死亡等 (Martelli, 1993)。葡萄皱木复合病主要由线性病毒科 (*Flexiviridae*) 葡萄病毒属 (*Vitivirus*) 病毒引起, 其中葡萄病毒 A (*Grapevine virus A*, GVA) 是主要病原之一 (Martelli et al., 1997), 其还与南非葡萄西拉衰退病有关 (Goszczynski et al., 2008)。目前 GVA 已在南非 (Goszczynski & Jooste, 2003)、意大利 (Murolo et al., 2008)、法国 (Hommay et al., 2008)、澳大利亚、美国 (Goszczynski & Habili, 2012) 以及中国 (任芳 等, 2012; 王建辉 等, 2013) 等普遍发生, 危害趋势不断加重。

目前葡萄病毒检测常用的 ELISA 血清学检测方法简单快速, 但灵敏度略低于分子检测方法, 且 GVA 抗血清需从国外进口, 本实验室制备了 GVA 多克隆抗体, 但尚只能对少数样品检测成功 (任芳 等, 2014); RT-PCR 是另一广泛应用的方法, 但其在灵敏度和检测范围上还有一定不足。实时荧光定量 RT-PCR (Real-time fluorescent quantitative RT-PCR, RT-qPCR) 具有特异性强、灵敏度高等优点, 在多种果树病毒检测中灵敏度普遍达常规 RT-PCR 的 100 倍以上 (Beuve et al., 2007; Loconsole et al., 2010; 秦子禹 等, 2015; Chen et al., 2016; 周俊 等, 2016)。目前国际上已建立葡萄卷叶伴随病毒、皱木复合相关病毒、扇叶病毒、斑点病毒等主要葡萄病毒的 RT-qPCR 方法 (Beuve et al., 2007; Osman & Rowhani, 2008; Poojari et al., 2016; Bruisson et al., 2017)。国内目前仅报道了葡萄扇叶病毒 (周俊 等, 2016)、葡萄卷叶伴随病毒-3 (乾义柯 等, 2017) 和葡萄斑点病毒 (卓娜 等, 2011) 等少数几种葡萄病毒的 RT-qPCR 检测方法, 多种葡萄病毒的 RT-qPCR 检测还未见报道。

本研究中建立了一种 GVA SYBR Green I 染料法 RT-qPCR 检测技术, 并对不同季节和不同部位田间葡萄样品进行检测验证和比较, 以期为 GVA 的高效、准确检测提供一种可靠的技术手段, 为检测样品的取样时间及部位提供选择依据, 并为进一步分析病毒浓度变化规律提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

2016—2017 年从辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心毒源保存圃采集葡萄嫩叶 (枝条顶端嫩梢从上往下第 2、3 片叶)、嫩叶柄、老叶 (枝条基部自下往上第 2、3

片叶)、老叶柄、卷须和一年生休眠枝条等样品备用。

10× PCR Buffer、dNTPs、*Taq* 酶、DNA Marker DL2000、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 *Escherichia coli* DH5α 感受态购自大连宝生物公司 (TaKaRa); M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; 2× SYBR Green qPCR Mix、pTOPO-TA Vector、胶回收试剂盒购自北京艾德莱生物有限公司; 实时荧光定量 RT-PCR 管购自美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪为美国 BIO-RAD CFX Connect™ Real-Time System。

1.2 引物设计及克隆鉴定

根据 GenBank 已登录序列和本实验室获得的 GVA 辽宁分离物序列 (任芳 等, 2012), 利用软件 Primer premier 5.0 及 Oligo 7.0 设计引物, 并参考文献报道 (Osman & Rowhani, 2008) 部分 GVA 引物略作修改, 设计和合成 4 对 GVA 特异性引物 QA1F/1R、QA2F/2R、QA3F/3R 和 QA4F/2R (表 1), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 GVA 实时荧光定量 RT-PCR 引物序列
Table 1 Sequences of GVA primers used in RT-qPCR detection

引物名称 Primer name	目标基因 Target gene	引物/探针序列 (5' - 3') Primer/Probe sequence	产物大小/bp Product size	参考文献 Reference
QA1F/1R	CP	F: CGACCGAAATATGTACCTGAATACTC R: TTGCTAGCTTTAGGACCTACTATATCTACCT	111	Osman & Rowhani, 2008 本研究 This study
QA2F/2R	CP	F: CGACCGAACTATGTACCTGAATACTC R: AGGACCTACTATATCTACCTC	100	Osman & Rowhani, 2008 本研究 This study
QA3F/3R	CP	F: CGACCGAAATATGTACCTGAACACTC R: TTGCTAGCTTTAGGTCTACTATATCTACCT	111	本研究 This study 本研究 This study
QA4F/2R	CP	F: CGACCGAATATGTACCTGAATACTC R: AGGACCTACTATATCTACCTC	100	本研究 This study 本研究 This study

取葡萄相应部位样品 50 mg, 采用吸附柱法 (MacKenzie et al., 1997) 进行总 RNA 提取, -80 °C 保存备用。采用两种方法反转录: (1) 普通反转录体系 25.0 μL: 将 5.0 μL 总 RNA 与 1.0 μL 0.1 μg · μL⁻¹ 随机引物和 9.0 μL 水混合, 95 °C 变性 5 min 后立即置于冰中冷却 2 min; 加入 5.0 μL 5× MLV-RT buffer、1.25 μL 10 mmol · L⁻¹ dNTPs、0.5 μL 200 U · μL⁻¹ M-MLV 和 3.25 μL DEPC 水, 经 37 °C 10 min、42 °C 50 min、70 °C 5 min 合成 cDNA; (2) 去除基因组 DNA 反转录 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, Takara): 取 5× gDNA Eraser buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, 总 RNA 1.0 μL 混匀, 42.0 °C 2 min; 加入以下混合液: PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL, RT Primer Mix 1.0 μL, 5× PrimeScript buffer 2 4.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL; 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, -20 °C 保存备用。

分别采用常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 对 4 对引物进行扩增和筛选。以普通反转录合成的 cDNA 为模板进行常规 RT-PCR 扩增, 反应体系 25 μL, 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 35 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。相同模板同时用于 RT-qPCR 扩增, 反应体系 25 μL, 含 2× SYBR Green I qPCR Mix 12.5 μL, 10 μmol · L⁻¹ 正、反向引物各 0.5 μL, DNase/RNase Free dH₂O 10.5 μL 和 cDNA 1 μL。反应条件: 95 °C 预变性 3 min,

95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s, 40 个循环, 在延伸步骤记录荧光信号。RT-qPCR 扩增产物的熔解曲线分析温度范围为 60 ~ 95 °C, 其中每 5 s 增加温度 0.5 °C, 以鉴别引物二聚体和非特异性扩增。以扩增曲线 C_q 值 (扩增产物荧光信号达到设定的阈值所经过的扩增循环次数) < 30 且熔解曲线为单一峰判定为阳性。以去除基因组 DNA 反转录合成的 cDNA 10 倍梯度稀释为模板进行 RT-qPCR 扩增, 构建标准曲线, 每个梯度设置 3 个重复。

PCR 扩增产物胶回收纯化后与 pTOPO-TA Vector 连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取白色菌落进行菌液培养, PCR 鉴定筛选阳性克隆, 将阳性克隆送北京诺赛基因组研究中心进行测序。采用 NCBI BLAST 方法比较所得序列与 GenBank 已登录分离物的同源性。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR 反应体系优化及验证

1.3.1 反应体系优化

以去除基因组 DNA 反转录合成的 cDNA 1×10^1 稀释作为模板, 用不同退火温度 (50.0、50.8、52.4、54.7、57.6、60.0、61.3 和 62.0 °C) 进行 RT-qPCR 扩增, 根据 C_q 值和扩增效果选择确定最佳退火温度; 在最佳退火温度下, 分别采用不同引物浓度 (100、200、300、400 和 500 nmol · L⁻¹) 进行 RT-qPCR 扩增, 根据 C_q 值和扩增效果选择确定最佳引物浓度。

1.3.2 特异性检测

从本实验室毒源保存圃采集分别感染了 GVA、葡萄病毒 B (*Grapevine virus B*, GVB)、葡萄病毒 E (*Grapevine virus E*, GVE)、葡萄卷叶伴随病毒 GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-7、葡萄斑点病毒 (*Grapevine fleck virus*, GFKV) 和沙地葡萄茎痘病毒 (*Grapevine rupestris stem pitting associated virus*, GRSPaV) 的葡萄样品, 提取总 RNA, 采用普通反转录合成 cDNA, 用于 RT-qPCR 特异性检测, 以健康无毒植株样品作阴性对照。

1.3.3 灵敏度比较

以普通反转录合成的 cDNA 10 倍梯度稀释 ($1 \sim 10^9$) 为模板, 进行常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测, 比较检测灵敏度。

1.3.4 重复性试验

从同一 GVA 带毒植株同一枝条上分别取 3 份样品作为生物学重复, 以相同方法同时提取总 RNA, 以去除基因组 DNA 反转录合成的 cDNA 1×10^2 稀释为模板进行 RT-qPCR 扩增, 每份样品 3 次重复。分别计算每份样品组内重复以及 3 份样品组间重复的平均 C_q 值和 C_q 值标准差 (SD) 和变异系数 (CV , % = 标准差/平均 C_q 值 $\times 100$)。

1.4 田间样品检测

1.4.1 不同季节和不同部位葡萄样品检测

选择前期经 ELISA 或常规 RT-PCR 检测 GVA 为阳性的 10 株田间葡萄植株, 分别在 5 月 (春)、7 月 (夏)、9 月 (秋) 采集植株上部嫩叶、上部嫩叶柄、下部老叶、下部老叶柄和卷须 5 个部位样品, 11 月 (冬) 采集休眠枝条, 同时采集健康无毒植株样品作阴性对照。所有样品采用普通反转录合成 cDNA, 用于常规 RT-PCR 和 RT-qPCR, 比较检测效果。

1.4.2 大量田间葡萄样品检测

根据不同季节和不同部位葡萄样品的检测效果, 2016—2017 年采集大量田间葡萄样品相应部位, 分别采用常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测 GVA, 比较检测效果。

2 结果与分析

2.1 引物设计与筛选

选择前期经 ELISA 或常规 RT-PCR 检测 GVA 为阳性的 5 个葡萄样品, 以健康无毒的葡萄样品作为阴性对照, 分别进行常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 扩增。4 对引物均在 5 个阳性样品中扩增到目的条带, 阴性对照和水对照没有条带, 但引物 QA3F/3R 有 1 个样品, 引物 QA4F/2R 所有样品的目的条带较弱, 引物 QA1F/1R 和 QA2F/2R 所有目的条带明亮且均为单一目的条带, 扩增效果较好 (图 1)。

4 对引物 5 个阳性样品 RT-qPCR 扩增曲线 C_q 值均小于 30, 熔解曲线均为单一峰, 判定为阳性。但引物 QA4F/2R 扩增阴性对照和水对照也有明显扩增曲线且熔解曲线有峰, 表明该引物有非特异性扩增, 因此只选择引物 QA1F/1R、QA2F/2R 和 QA3F/3R 进行标准曲线构建。

3 对引物在 $1 \sim 10^{-5}$ 稀释梯度范围内扩增曲线呈梯度分布, QA1F/1R 扩增效率 (E) 为 112.5%, 决定系数 (R^2) = 0.990, 扩增效率过高, 标准曲线相关性略差; QA2F/2R 的扩增效率为 99.2%, $R^2 = 0.999$, 均达到统计分析要求; QA3F/3R 的扩增效率为 103.7%, $R^2 = 0.981$, 决定系数过低, 标准曲线相关性较差。

综合 RT-PCR、RT-qPCR 扩增以及标准曲线分析结果, 选择扩增效果和相关性均最好的 QA2F/2R 作为 GVA RT-qPCR 检测引物。

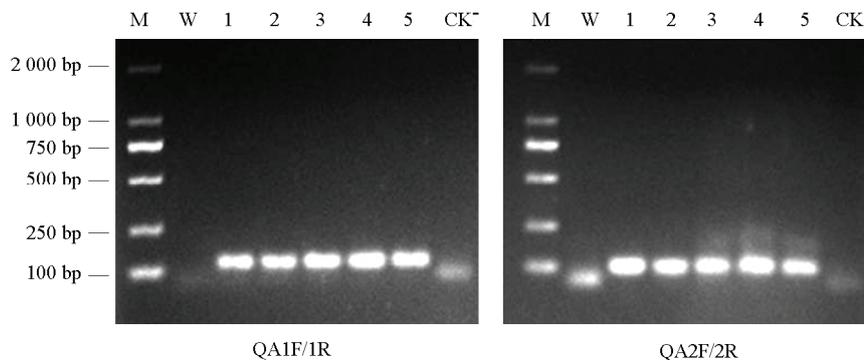


图 1 GVA 引物 QA1F/1R 和 QA2F/2R RT-PCR 扩增结果比较

M: DL2000; W: 清水对照; 1~5: GVA 阳性的葡萄样品; CK⁻: 阴性对照。

Fig. 1 Comparison of RT-PCR amplification of GVA primers QA1F/1R and QA2F/2R

M: DL2000; W: Water control;

1 - 5: GVA positive grapevine samples; CK⁻: Negative control.

2.2 克隆鉴定

采用引物 QA2F/2R 对‘秋蜜’葡萄进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经克隆测序共获得 6 个克隆序列, 其中 5 个克隆序列完全一致, 经 NCBI BLAST 比对, 与 GenBank 已登录 GVA 序列相似性较高, 达 94%~99%, 表明扩增片段正确, 为 GVA 目的片段 (图 2)。

GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-7、GFKV 和 GRSPaV 等病毒的葡萄样品以及阴性对照葡萄样品, 只有感染 GVA 样品有扩增曲线, C_q 值为 21.59, 其余样品均没有明显扩增曲线, 与阴性对照扩增结果相近 (图 3), 表明该 RT-qPCR 方法可特异性检测 GVA。

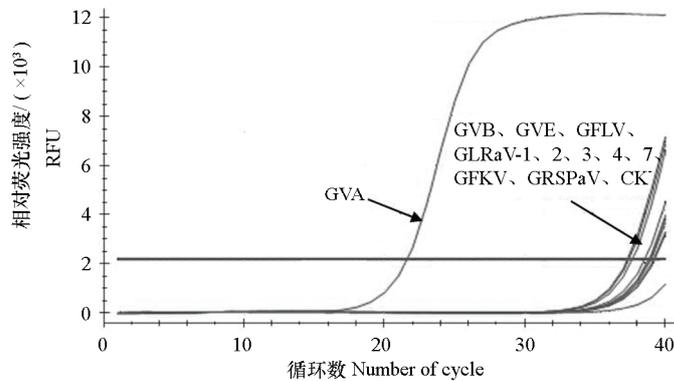


图 3 RT-qPCR 特异性检测
 Fig. 3 The specificity test of RT-qPCR

2.4.2 灵敏度比较

常规 RT-PCR 能检测到 1×10^{-2} 稀释梯度的 GVA 阳性葡萄样品 cDNA (图 4)。RT-qPCR 检测各稀释梯度模板扩增曲线呈梯度分布, 检测 1×10^{-4} 稀释梯度时 C_q 值仍小于 30 (图 5), 为阳性, 表明本研究中 RT-qPCR 检测灵敏度可达常规 RT-PCR 的 100 倍。

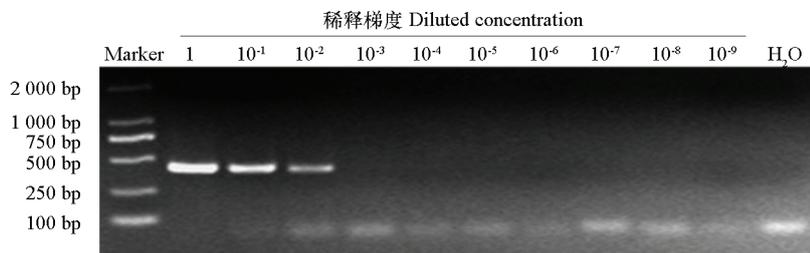


图 4 不同稀释梯度葡萄样品常规 RT-PCR 检测灵敏度
 Fig. 4 Sensitivity of RT-PCR detection of grapevine samples at different diluted gradient

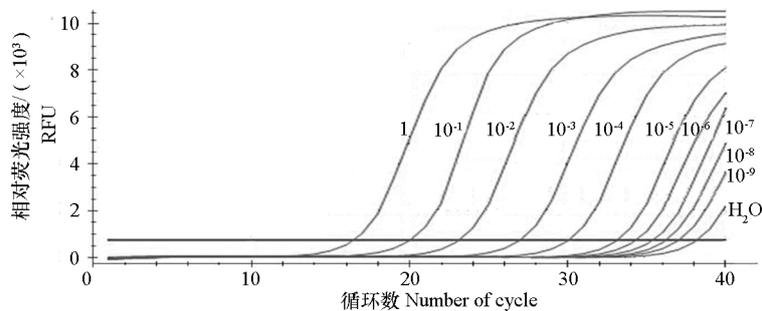


图 5 不同稀释梯度葡萄样品 RT-qPCR 检测灵敏度
 Fig. 5 Sensitivity of RT-qPCR detection of grapevine samples at different diluted gradient

2.4.3 重复性试验

根据 RT-qPCR 扩增 C_q 值数据进行统计学分析, 同一枝条上 3 份样品组内重复的变异系数最大

为 0.31%，组间重复变异系数为 2.91%（表 2），表明该方法具有较好的重复性，检测稳定性好。

表 2 重复性试验结果

Table 2 The result of reproducibility

重复类型 Repeat type	重复组编号 Number of repeat group	C_q 平均值 Mean C_q value	标准差 SD	变异系数/% CV
组内重复 Reproducibility test of intra-assay	1	26.99	0.05	0.19
	2	25.71	0.08	0.31
	3	25.63	0.04	0.16
组间重复 Reproducibility test of extra-assay		26.11	0.76	2.91

2.5 田间样品检测

2.5.1 不同季节和不同部位葡萄样品检测

从 10 株感染 GVA 的葡萄上分别采集春、夏、秋 3 个季节的嫩叶、嫩叶柄、老叶、老叶柄和卷须 5 个部位样品以及冬季休眠枝条，共 160 个样品，分别采用常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 进行 GVA 检测。结果（表 3）表明，RT-qPCR 对各季节和部位样品的检出率普遍高于常规 RT-PCR。不同季节比较，RT-qPCR 冬季检出率 100%，比常规 RT-PCR 高 10%，秋季仅嫩叶检出率略低（50%），其余 4 个部位检出率均达 100%，比常规 RT-PCR 高 10%~80%，春夏季检出率 10%~100%，比常规 RT-PCR 高 10%~40%。不同部位比较，枝条和老叶柄样品检测效果最好，RT-qPCR 检测春、夏、

表 3 不同季节和不同部位葡萄样品常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测结果

Table 3 RT-PCR and qRT-PCR detection of samples collected from different seasons and different positions of grapevine

方法 Method	品种 Cultivar	春 Spring					夏 Summer					秋 Autumn					冬季枝条 Dormant branch of winter
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
RT-PCR	巨玫瑰 Jumeigui	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	红双味-1 Hongshuangwei-1	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	库特赛塔 Kutesarta	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红蜚 Hongjian	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	红双味-2 Hongshuangwei-2	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
	黑拉查基 Heilachaji	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	大宝 Taiho	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	乌兹别克玫瑰 Muscat Uzbekistan	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
	宁夏蛇龙珠 Ningxia Cabernet Gernischet	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	秋蜜 Qiumi	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
检出率/% Detection rate		10	50	70	80	40	0	30	60	80	30	40	70	60	80	20	90
RT-qPCR	巨玫瑰 Jumeigui	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红双味 Hongshuangwei	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	库特赛塔 Kutesarta	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红蜚 Hongjian	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	红双味 Hongshuangwei	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	黑拉查基 Heilachaji	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	大宝 Taiho	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	乌兹别克玫瑰 Muscat Uzbekistan	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	宁夏蛇龙珠 Ningxia Cabernet Gernischet	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	秋蜜 Qiumi	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
检出率/% Detection rate		20	40	80	100	60	10	70	80	100	40	50	100	100	100	100	100

注：A：嫩叶；B：嫩叶柄；C：老叶；D：老叶柄；E：卷须。

Note: A: Young leaf; B: Young petiole; C: Old leaf; D: Old petiole; E: Tendril.

秋 3 个季节的老叶柄和冬季枝条样品检出率均为 100%, 比常规 RT-PCR 高 10%~20%, 其次为老叶, 检出率达 80%~100%, 比常规 RT-PCR 高 20%~30%, 其余部位样品检出率也普遍高于常规 RT-PCR, 其中嫩叶样品检出率最低, RT-qPCR 检出率为 10%~50%, 常规 RT-PCR 为 0~40%。

2.5.2 大量田间葡萄样品检测

由于老叶柄和枝条样品检测效果最好, 2016 年冬季采集 110 个葡萄休眠枝条样品, 2017 年秋季采集 273 个老叶柄样品, 分别采用常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测 GVA 带毒情况。结果表明, 2016 年 110 个枝条样品 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测均有 7 个样品为阳性, 检出率 6.4%, 两种方法检测结果一致。2017 年 273 个样品常规 RT-PCR 检测有 3 个为阳性, 检出率 1.1%, 而 RT-qPCR 检测有 9 个样品阳性, 检出率 3.3%, 是常规 RT-PCR 的 3 倍。

3 讨论

外壳蛋白是植物病毒中比较保守的区域。本研究根据文献报道 (Osman & Rowhani, 2008) 和 GenBank 已登录的 GVA CP 序列设计并筛选出一对引物 QA2F/2R, 建立了 GVA SYBR Green I 染料法 RT-qPCR 检测技术体系, 该技术检测特异性好, 灵敏度高, 检测灵敏度达常规 RT-PCR 的 100 倍, 与已报道的 GLRaV-2 (Beuve et al., 2007)、GFLV (周俊 等, 2016)、ASPV (秦子禹 等, 2015) 等葡萄和苹果病毒 RT-qPCR 检测灵敏度相当。将建立的 RT-qPCR 检测技术用于检测不同季节和不同部位葡萄样品中 GVA 感染情况, 结果表明, RT-qPCR 检测适用范围广, 其可实现 GVA 的全年检测, 对春、夏、秋季老叶柄和冬季枝条样品均可准确检测, 检出率均达 100%, 比常规 RT-PCR 高 10%~20%。其次为老叶, 检出率达 80%~100%, 比常规 RT-PCR 高 20%~30%。其余季节和部位样品的检出率 (10%~100%) 也比常规 RT-PCR (0~70%) 明显提高。此外还发现, 随着季节变化 RT-qPCR 检出率逐渐上升, 秋、冬季检出率最高, 秋季除嫩叶外其余 4 个部位的样品检出率均为 100%。在大量田间样品检测时, 休眠枝条样品 RT-qPCR 检测结果与常规 RT-PCR 基本一致, 而秋季老叶柄样品 RT-qPCR 检测效果明显优于常规 RT-PCR。

本文是国内首次报道 GVA 的 RT-qPCR 检测技术, 该方法特异性好、灵敏度高、重复性好且检测范围广, 可在各个季节实现对 GVA 的快速准确检测。此外, 本研究结果还可为 GVA 检测最佳取样时间或部位的选择提供依据, 除常规 RT-PCR 常用的冬季葡萄休眠枝条外, 推荐采用老叶柄和老叶秋冬季检测效果最佳。

造成不同季节或不同部位中 GVA 检测结果差异的原因目前尚不明确, 可能与葡萄植株中病毒浓度有关。已有研究表明, 一些葡萄病毒在植株体内不同部位的浓度不同, 并且会随季节变化。如 GLRaV-3 在生长季早期即可从树干快速蔓延至新梢和叶片, 在夏季 6~7 月病毒浓度上升至最高, 生长季后期病毒浓度下降, 至生长季末期超过 90% 的样品中还可检测出 (Tsai et al., 2012)。本研究中秋季以后 GVA 总体检出率达 92% 以上, 与 GLRaV-3 类似。但 GLRaV-3 在夏季浓度最高, 而本研究 GVA 在夏季检出率低于秋季, 有待于进一步定量分析研究。另一种常见葡萄病毒 GFLV 的 ELISA 检测结果表明该病毒在营养生长初期 (5~6 月) 的嫩叶和卷须中浓度最高, 且在整个营养生长期嫩叶中病毒浓度一直维持在高水平, 因此推荐将嫩叶作为检测材料; 而韧皮部 qPCR 检测则表明韧皮部中 GFLV 在营养生长早期 (5 月) 和休眠期 (1 月) 浓度最高, 在夏季 (7 月) 最低, 营养生长期以外时期的韧皮部样品均为阳性, 因此可作为营养生长期以外时期的检测材料 (Krebelj et al., 2015)。本研究中 GVA 在各个季节均是嫩叶检出率最低, 因此不推荐嫩叶作为 GVA 最佳检测材料。

GVA 与 GFLV 两种病毒在寄主中的分布和变化规律不同是真实情况的体现, 还是由于检测方法差异导致还无法确定。本研究中采用的 RT-qPCR 方法, GFLV 采用的 ELISA 方法, 两种方法检测灵敏度有差异 (Krebelj et al., 2015); 另一方面本研究中仅对 GVA 进行了定性检测, 比较检出率差异, 未进行病毒浓度的定量分析, 检出率和 GVA 浓度是否呈正相关尚不能确定, 两种病毒在寄主体内的分布和季节变化规律是否具有差异还有待于进一步研究。因此, 在下一步的研究中将应用所建立的 GVA RT-qPCR 检测技术进行不同季节和不同部位中 GVA 病毒浓度的定量分析, 为掌握 GVA 在寄主体内的分布和季节变化规律, 从而为葡萄病毒检测和脱毒选材提供依据, 为深入研究了解病毒发生流行及与寄主互作机制等提供参考。

References

- Beuve M, Sempé L, Lemaire O. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *Journal of Virological Methods*, 141 (2): 117 - 124.
- Bruissson S, Lebel S, Walter B, Prevotat L, Seddas S, Schellenbaum P. 2017. Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan[®] RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods*, 240: 73 - 77.
- Chen Hongming, Zhou Yan, Wang Xuefeng, Zhou Changyong, Yang Xiuyan, Li Zhongnan. 2016. Detection of *Citrus yellow vein clearing virus* by Quantitative Real-time RT-PCR. *Horticultural Plant Journal*, 2 (4): 188 - 192.
- Goszczynski D E, du Preez J, Burger J T. 2008. Molecular divergence of *Grapevine virus A* (GVA) variants associated with Shiraz disease in South Africa. *Virus Research*, 138 (1 - 2): 105 - 110.
- Goszczynski D E, Habili N. 2012. *Grapevine virus A* variants of group II associated with Shiraz disease in South Africa are present in plants affected by Australian Shiraz disease, and have also been detected in the USA. *Plant Pathology*, 61 (1): 205 - 214.
- Goszczynski D E, Jooste A E C. 2003. Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (4): 397 - 403.
- Hommay G, Komar V, Lemaire O, Herrbach E. 2008. *Grapevine virus A* transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology*, 121 (2): 185 - 188.
- Krebelj A J, Čepin U, Ravnikar M, Novak M P. 2015. Spatio-temporal distribution of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 142: 159 - 171.
- Loconsole G, Saponari M, Savino V. 2010. Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 128 (2): 251 - 259.
- MacKenzie D J, McLean M A, Mukerji S, Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222 - 226.
- Martelli G P. 1993. Rugose wood complex: Martelli G P. Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis. Rome: Food and Agri- culture Organization of the United Nations: 45 - 54.
- Martelli G P, Minafra A, Saldarelli P. 1997. *Vitivirus*, a new genus of plant virus. *Archives of Virology*, 142 (9): 1929 - 1932.
- Murolo S, Romanazzi G, Rowhani A, Minafra A, La Notte P, Branzanti M B, Savino V. 2008. Genetic variability and population structure of *Grapevine virus A* coat protein gene from naturally infected Italian vines. *European Journal of Plant Pathology*, 120 (2): 137 - 145.
- Osman F, Rowhani A. 2008. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses associated with rugose wood complex of grapevine. *Journal of Virological Methods*, 154 (1 - 2): 69 - 75.
- Poojari S, Alabi O J, Okubara P A, Naidu R A. 2016. SYBR[®] Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 235: 112 - 118.
- Qian Yi-ke, Zhang Na, Wei Shuang, Lu Ping, Zhang Xiang-lin. 2017. Using SYBR Green I RT-PCR based on DPO primers to detection *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Journal of Plant Protection*, 44 (2): 343 - 344. (in Chinese)
- 乾义柯, 张娜, 魏霜, 陆平, 张祥林. 2017. 基于 DPO 引物的 SYBR Green I 实时荧光 RT-PCR 检测葡萄卷叶伴随病毒 3 号. *植物保护学报*, 44 (2): 343 - 344.

- Qin Zi-yu, Sun Jian-she, Wang Na, Shao Jian-zhu. 2015. Development of a TaqMan real-time RT-PCR method for detecting *Apple stem pitting virus* (ASPV). *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (7): 1400 - 1408. (in Chinese)
- 秦子禹, 孙建设, 王 娜, 邵建柱. 2015. 苹果茎痘病毒 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. *园艺学报*, 42 (7): 1400 - 1408.
- Ren Fang, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2014. Prokaryotic expression of *Grapevine virus A* coat protein and antiserum preparation. *Acta Phytopathologica Sinica*, 44 (3): 327 - 331. (in Chinese)
- 任 芳, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 朱红娟. 2014. 葡萄病毒 A 外壳蛋白原核表达及抗血清制备. *植物病理学报*, 44 (3): 327 - 331.
- Ren Fang, Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Wang Jiao-min. 2012. Cloning and molecular variation analysis of coat protein gene of *Grapevine virus A*. *Molecular Plant Breeding*, 10 (5): 568 - 574. (in Chinese)
- 任 芳, 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 王教敏. 2012. 葡萄 A 病毒外壳蛋白基因克隆及分子变异分析. *分子植物育种*, 10 (5): 568 - 574.
- Tsai C W, Daugherty M P, Almeida R P P. 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in grapevine cultivars. *Plant Pathology*, 61: 977 - 985.
- Wang Jian-hui, Liu Jian-jun, Chen Ke-ling, Li Hong-wen, He Jian, Guan Bin. 2013. RT-PCR detections and phylogenetic studies on three viruses from grapevine. *Journal of Fruit Science*, 30 (2): 197 - 201. (in Chinese)
- 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 李洪雯, 何 建, 关 斌. 2013. 三种葡萄病毒的 RT-PCR 检测和系统进化分析. *果树学报*, 30 (2): 197 - 201.
- Zhou Jun, Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Hu Guo-jun, Ren Fang, Li Zheng-nan. 2016. Development and application of a quantitative RT-PCR approach for quantification of *Grapevine fanleaf virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (3): 538 - 548. (in Chinese)
- 周 俊, 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 胡国君, 任 芳, 李正男. 2016. 葡萄扇叶病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用. *园艺学报*, 43 (3): 538 - 548.
- Zhuo Na, Wang Guo-ping, Deng Cong-liang, Hong Ni. 2011. RT-PCR detection of *Grapevine fleck virus*. *Journal of Fruit Science*, 28 (4): 717 - 720. (in Chinese)
- 卓 娜, 王国平, 邓丛良, 洪 霓. 2011. 葡萄斑点病毒的 RT-PCR 检测. *果树学报*, 28 (4): 717 - 720.

征订

欢迎订阅 2019 年《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于 1962 年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,中国科技核心期刊;被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、Scopus 数据库、CSCD 中国科学引文数据库等多家数据库收录。

《园艺学报》荣获“第三届国家期刊奖”及“新中国 60 年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国科技期刊引证报告》核心版 2018 年公布的《园艺学报》核心总被引频次和综合评价均为学科第 1 位,在全国 2029 种核心期刊中排名第 11 位。

《中国学术期刊影响因子年报》2018 年最新数据显示,《园艺学报》影响力指数学科排名第 1 位,复合总被引频次为 11 582,复合影响因子为 1.498。

《园艺学报》为月刊,每月 25 日出版。每期定价 48 元,全年 576 元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮编: 100081; 电话: 010-82109523. E-mail: yuanixuebao@126.com。

网址: <http://www.ahs.ac.cn>。

