

三种桃病毒病害初步调查及病原检测

王海荣, 张安宁, 刘伟, 安淼, 董晓民, 余贤美*

山东省果树研究所, 山东泰安271000

摘要: 从山东省果树研究所桃试验基地采集‘玉妃’、‘超红’、‘岱妃’三个桃品种的幼嫩枝条22份样品, 利用6种病毒引物进行RT-PCR检测, 对桃病毒病的发生情况进行调查。结果表明, 从样品中扩增获得与苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、李属坏死环斑病毒(prunus necrotic ring spot virus, PNRSV)、樱桃绿环斑驳病毒(cherry green ring mottle virus, CGRMV)预期大小一致的目的片段, 其中, 从‘玉妃’桃中检测到ACLSV和CGRMV, 从‘超红’桃中检测到PNRSV, 从‘岱妃’桃中检测到CGRMV; 3种病毒中ACLSV和PNRSV的检出率为13.64%, CGRMV的检出率为40.91%。

关键词: 桃; 病毒病; 病原检测

Preliminary Investigation of Viral Diseases and Detection of the Pathogens from Three Cultivars of Peach

WANG Hai-Rong, ZHANG An-Ning, LIU Wei, AN Miao, DONG Xiao-Min, YU Xian-Mei*

Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China

Abstract: Virus diseases of peach were investigated by RT-PCR using 6 viral primers from 22 young stems of three varieties (*Prunus persica* cv. ‘yufei’, ‘chaohong’ and ‘daifei’) sampled from the resources nursery of Shandong institute of pomology. The results showed that apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), cherry green ring mottle virus (CGRMV) were detected from the samples with the detection ratio of 13.64%, 13.64%, and 40.91%, respectively, of which, ACLSV and CGRMV were detected from ‘yufei’, PNRSV from ‘chaohong’, and CGRMV from ‘daifei’.

Key words: peach; viral diseases; pathogen detection

桃(*Prunus persica*)系蔷薇科(Rosaceae)、李属桃亚属(*Amygdalus*)的多年生中型乔木, 在我国有着悠久的栽培历史。近年来, 随着栽培面积的不断扩大以及栽培中的苗木引种和调运、无性繁殖代数增多等因素, 加快了桃病毒病的传播和发生。桃树病毒病常引起叶片褪绿、斑驳、花叶、皱缩及枝条节间缩短变粗等, 症状会因病毒株系、寄主品种的感病性以及环境条件的不同而有所差异(刘建和杨莉莉1999; 于绍夫等1992)。桃病毒病的发生能够降低发芽率, 延迟开花, 产量下降, 严重时导致花芽死亡, 果实品质变劣, 极大地影响了桃树的经济价值(李青等1993; 王国平和洪霓1997; Desvignes和Boye 1998)。

据报道, 国内外桃树上发现的病毒病已有30余种(于绍夫等1992; 李青等1993)。当前, 我国桃树上的病毒病原主要有苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、李属坏死环斑病毒(prunus necrotic ring spot 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)、杏假褪绿叶斑病毒(apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus, APCLSV)和李树皮坏死茎纹孔伴随病毒(plum bark necrosis stem pitting-associated virus, PBNSPaV) (李世访和卢美光2013; 傅润民1998; Parakh等1995)等。ACLSV能够使叶片枝条和果实产生明显病害症状, 许多栽培品种感染此病毒后可减产30%~40% (Nemchinov等1995; Wu等1998; Cembali等2003)。PNRSV在苗圃里能够引起严重病害, 使树体在花芽期和生长期长势不一致, 延迟果实成熟, 严重时导致花芽和根死亡。接穗和砧木感染PNRSV时会导致发芽率降低(Lang等

收稿 2015-07-24 修定 2015-10-27

资助 山东省果树研究所所长基金(2012KY06)和国家桃产业体系(CARS-31)。

* 通讯作者(E-mail: yuxianmei95@163.com; Tel: 0538-8266591)。

1998)。APCLSV主要引起枝条和茎干开裂、凹陷,叶片萎缩坏死,有斑点,叶脉黄化,畸形等症状(李世访和卢美光2013)。PBNSPaV的侵染会导致果实变小,变形,表皮褶皱,成熟延迟等症状(李世访和卢美光2013)。PDV能够引起桃新梢短缩病症状和丛簇衰退病症状,当PDV与PNRSV混合侵染时,在出现症状的当年就会减产三成,翌年减产达六成(于绍夫1994);CGRMV能够导致叶片黄斑、环状斑驳、畸形,CGRMV和ACLSV对大多数李属果树表现出潜伏侵染(Polák和Svoboda 2006; Ulubas和Ertunc 2005; Zhang等1998)。据此,笔者对‘玉妃’、‘超红’、‘岱妃’3个桃新品种的病毒病进行检测,以此为桃脱毒苗的研究提供重要依据。

材料与方法

1 材料

1.1 供试植物

于2014年9月份,对山东省果树研究所桃试验

基地(泰安)的‘玉妃’、‘超红’、‘岱妃’3种桃[*Prunus persica* (L.) Batch]的病毒病发生情况进行调查。‘玉妃’和‘超红’各选10棵树,‘岱妃’选2棵树,每棵树采集10个枝条作为一个样品,随机采集有疑似病毒病和无发病症状的幼嫩部位枝条,装入塑料袋,编号标记后立即放入冰盒,将枝条带回实验室取叶片作为待测样品,部分采样枝条见图1。

1.2 主要试剂

TRIzol试剂(商品名为TRNzol Reagent)购自北京天根生化科技有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒购自Axygen试剂公司。

2 试验方法

2.1 总RNA的提取

采用TRIzol法(He等2011)提取桃叶片的总RNA,并稍作改进。具体步骤如下:取0.1 g植物组织,加入2 mL EP管中,经液氮冷冻后用研磨仪研磨成粉末,加入保存在4 °C下的提取试剂1.0 mL,振荡至彻底混匀,使离心管尽量平放,冰上放置



图1 三种桃品种采样图片

Fig.1 The sample photos from three cultivars of peach

A~C为‘岱妃’,D~F为‘玉妃’,G~I为‘超红’,A、D、G为无症状叶片,其他为病叶。

5~7 min, 在4 °C、12 000 r·min⁻¹条件下离心5 min。然后取出离心管, 将上清液转移到事先准备好的无RNase的离心管中, 再加入0.2 mL氯仿, 充分混匀, 在4 °C、12 000 r·min⁻¹条件下离心10 min, 吸取离心后的上层水相, 将其转移到新的无RNase离心管中。取异丙醇(体积与所得水相相同)加入至沉淀, 充分混匀, 冰上静置10 min, 在4 °C、12 000 r·min⁻¹条件下离心10 min后, 弃掉上清, 加1 mL 75%乙醇至离心管, 调整离心条件为4 °C、5 000 r·min⁻¹, 待离心5 min后去除液体, 将沉淀在室温下静置干燥2~3 min。加35 μL无RNase的灭菌水, 用枪头反复吹打, 使RNA全部溶解, 充分混匀后保存备用。从母液中吸取少量的RNA溶液进行稀释, 然后上样于紫外分光光度计, 检测其浓度和纯度。OD₂₆₀/OD₂₈₀≈1.8~2.1, 表明RNA溶液较纯。此外, 用1%琼脂糖凝胶电泳来检测所提取或提纯的RNA是否降解。所获得的RNA溶液保存于-80 °C冰箱中, 备用。

2.2 引物设计

用于检测6个病毒的相关引物及序列详见表1。

2.3 RT-PCR

2.3.1 反转录

在1.5 mL离心管中加入1 μL RNA模板, 2 μL dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹), 2 μL 5×M-MLV buffer, 0.5 μL 6-Rad (20 μmol·L⁻¹), 0.5 μL oligo (dT) (20 μmol·L⁻¹), 0.5 μL RNase inhibitor (40 U·μL⁻¹), 0.5 μL M-MLV反转录酶(200 U·μL⁻¹), 加ddH₂O至总体积为10 μL, 25 °C下放置10 min, 42 °C下1 h后, 移至

冰上放置2 min, -20 °C保存备用。

2.3.2 PCR扩增

PCR体系为2×Taq PCR Mastermix 7.5 μL, 20 μmol·L⁻¹ R-primer和20 μmol·L⁻¹ F-primer各0.5 μL, 反转录产物1 μL, 加ddH₂O至总体积为15 μL, 充分混匀后置于PCR仪中。

检测ACLSCV和CGRMV的反应程序是: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸50 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

检测PNRSV、APCLSV和PBNSPaV的反应程序是: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火35 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

检测PDV的反应程序是: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

2.4 PCR产物克隆及序列分析

PCR产物的纯化、连接转化和克隆筛选: 按试剂盒操作指南, 使用Axygen凝胶回收试剂盒进行扩增产物的纯化, 分别将纯化产物连接至pGEM-T克隆载体, 并转化大肠杆菌DH5α感受态细胞, 挑取单菌落置于1 mL LB (含氨苄青霉素)培养基中培养, 通过菌液PCR检测来鉴定重组质粒。

目的片段的序列测定和分析: 经菌液PCR, 每个病毒各筛选3个阳性菌液送至苏州金唯智生物科技有限公司进行序列测定。通过BLAST数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索目的片段的同源序列, 并用DNAMAN软件对所得6种病毒的基因片段序列进行分析。

表1 RT-PCR反应所用特异性引物

Table 1 Virus-specific primers used in the RT-PCR assay

引物	序列(5'→3')	基因位置	产物大小/bp	登录号	参考文献
ACLSCV	F: TCTGCAAGAGAATTTTCAGTT	6 738~6 757	800	NC001409	卢美光等2015
	R: GTCTACAGGCTATTTATTATAAG	7 537~7 515			
APCLSV	F: TGGATGATCCTGGTTTGA	6 143~6 160	544	AY713379	Niu等2012
	R: TCTGAGTAAGCTGATCCAGC	6 667~6 686			
CGRMV	F: TCGGGAAATCAACTCTTGTC	6 276~6 296	363	AJ291761	卢美光等2015
	R: TGTGCCACCAACACCTTAC	6 638~6 619			
PNRSV	F: GAACCTCCTTCCGATTTAG	527~545	346	AJ133208	Yu等2013
	R: GCTTCCCTAACGGGGCATCCAC	884~863			
PBNSPaV	F: CTGGTCTTCTGCTACTCCTT	260~280	195	KJ792828	Cui等2011
	R: AAGCCACAATCTCAGAGCG	435~454			
PDV	F: CGAAGTCTATTTCCGAGTGG	1 340~1 359	304	NC-008038	宗晓娟等2012
	R: CCACTGGCTTGTTCGCTGT	1 624~1 643			

实验结果

1 侵染桃的几种病毒的RT-PCR检测及分析

以不同品种的桃叶片的总RNA的反转录产物为模板,分别进行单重RT-PCR扩增,PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,切取目的条带,经凝胶回收试剂盒回收纯化后连接至pGEM-T,克隆测序。结果如图2显示,ACLSV引物组合可扩增得到800 bp的片段,与预期产物大小相同,与GenBank中已报道的病毒分离物的核苷酸序列(登录号NC001409)

同源率为96%;CGRMV引物组合可扩增得到363 bp的片段,与GenBank中已报道的病毒分离物的核苷酸序列(登录号AJ291761)同源率为92%~96%;PNRSV引物组合可扩增得到357 bp的片段,与GenBank中已报道的病毒分离物的核苷酸序列(登录号AJ133208)同源率为99%。

2 样品带毒检出率

对供试的22份桃样品进行6种病毒的检测,结果(表2)显示,仅检测到3种病毒,分别是ACLSV、PNRSV和CGRMV,而未检测到另外3种病毒(AP-

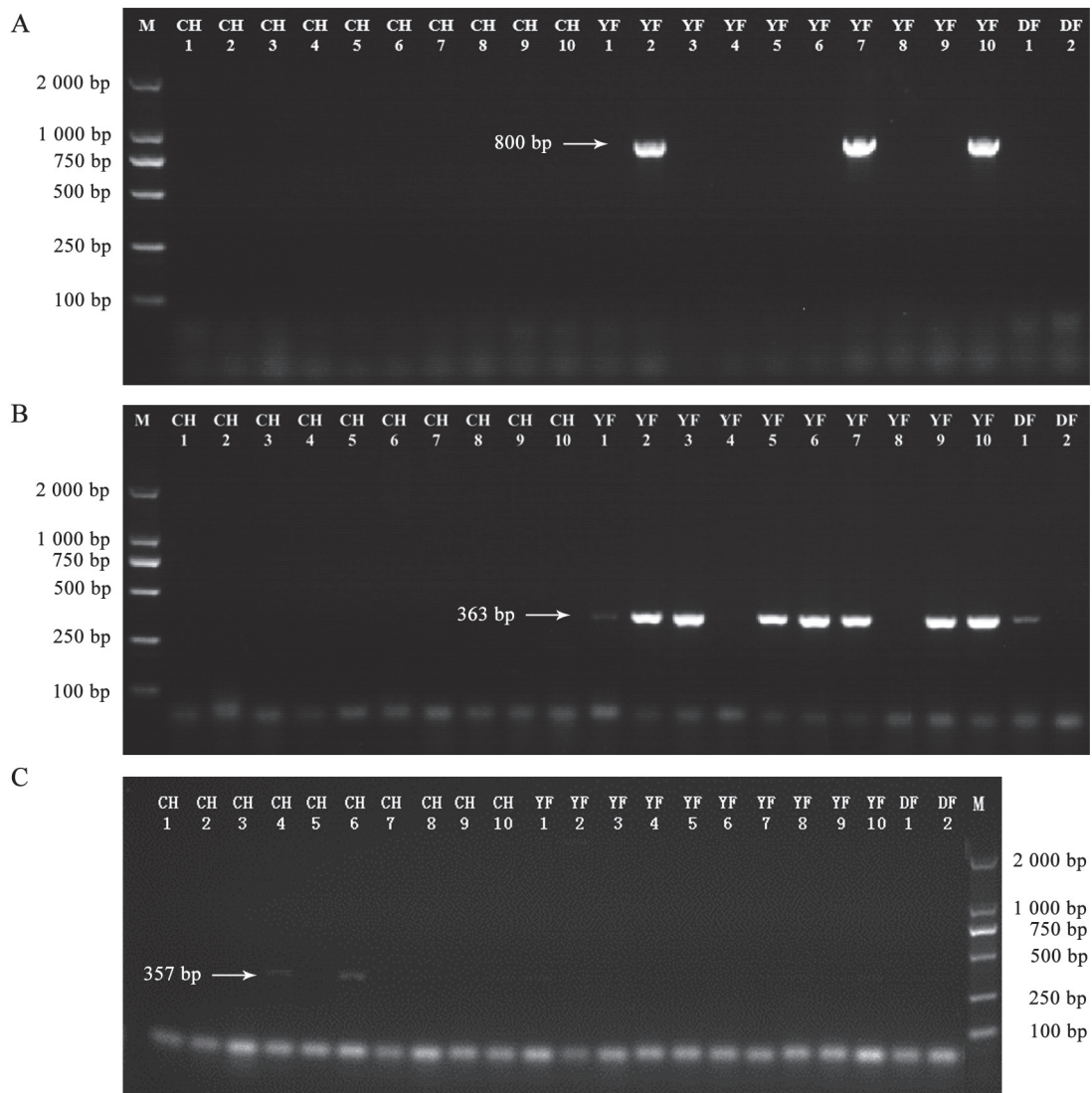


图2 单重RT-PCR 的特异性分析

Fig.2 Specific analysis of RT-PCR

A: ACLSV检测琼脂糖凝胶电泳; B: CGRMV检测琼脂糖凝胶电泳; C: PNRSV检测琼脂糖凝胶电泳。CH1~CH10为‘超红’样品的编号; YF1~YF10为‘玉妃’样品的编号; DF1、DF2为‘岱妃’样品编号。

表2 桃样品病毒检测情况
Table 2 The virus detection from peach

编号	症状	RT-PCR检测结果					
		ACLSV	PNRSV	CGRMV	APCLSV	PBNPaV	PDV
CH4	叶皱缩	-	+	-	-	-	-
CH6	叶皱缩	-	+	-	-	-	-
CH10	叶皱缩	-	+	-	-	-	-
YF1	无	-	-	+	-	-	-
YF2	叶皱缩	+	-	+	-	-	-
YF3	无	-	-	+	-	-	-
YF5	叶皱缩	-	-	+	-	-	-
YF6	叶轻微皱缩	-	-	+	-	-	-
YF7	无	+	-	+	-	-	-
YF9	无	-	-	+	-	-	-
YF10	叶皱缩	+	-	+	-	-	-
DF1	叶皱缩	-	-	+	-	-	-

“-”表示无;“+”表示有。

CLSV、PBNPaV和PDV), 其中, 从‘玉妃’桃中检测到ACLSV和CGRMV, 从‘超红’桃中检测到PNRSV, 从‘岱妃’桃中检测到CGRMV。在检测到的3种病毒中, ACLSV和PNRSV的检出率均是13.64%, CGRMV的检出率是40.91%。

讨 论

我国拥有丰富的桃品种资源, 种植广泛, 而病毒病的发生一直是影响我国桃产业健康发展的重要原因之一, 在现有的技术水平下, 采用桃试管苗脱毒和快繁技术进行无毒化栽培, 仍是保证桃产量和提高品质的一个行之有效的办法, 而进行病毒检测是建立无病毒苗木繁殖的必要条件和关键步骤。

RT-PCR技术具有检测速度快、灵敏度高、特异性强的优势, 已用于多种植物病毒的诊断与检测。于云(2013)通过多重RT-PCR检测体系一次性扩增出ACLSV、CGRMV、PNRSV和APCLSV四种病毒的特异性片段, 而本文分别使用6种病毒的特异性引物, 通过两步法单重RT-PCR扩增出病毒ACLSV (800 bp)、CGRMV (363 bp)和PNRSV (357 bp)的特异性片段, 与多重RT-PCR相比, 检测时间较长, 特异性较弱, 这也是本实验下一步需要改进的地方, 需不断地优化反应条件, 使之既能保证检测的高灵敏度, 又能提高效率, 建立又快又准的桃树病毒常规田间检测体系。

本研究对我所桃试验基地(泰安)的3种桃的病毒病发生情况进行调查, 采用TRIzol试剂法提取总RNA, 经RT-PCR检测发现: ‘玉妃’桃中主要有ACLSV和CGRMV; ‘超红’桃中检测到PNRSV; ‘岱妃’桃中检测到CGRMV。其中, ACLSV和PNRSV的检出率均是13.64%, CGRMV的检出率是40.91%, 检测结果与已报道的在山东地区桃树上能够检测到的这3种病毒相符(李世访和卢美光2013)。

于云(2013)从我国12个省的505份桃树样品中检测到ACLSV、CGRMV、PNRSV和APCLSV四种病毒, 其中ACLSV的感染率最高达71.8%, APCLSV的感染率最低为1.6%, 而且山东省的病毒发生率最高达58.3%; 阮小凤等(1998)对陕西省桃主产区的病毒病的发生情况进行了调查和检测, 发现PNRSV和ACLSV两种病毒的发生较普遍, 单独感染率分别为35.1%和15.8%, 而PDV的单独感染率较低, 为1.4%, 各种病毒的混合感染都有出现; 牛飞庆(2012)从我国12个省的417份样品中检测出ACLSV、PNRSV和CGRMV三种病毒的带毒率分别是20%、6%和11%。可见, ACLSV、PNRSV和CGRMV这3种病毒在桃树有着较高的发病率, 而本研究中在‘玉妃’桃和‘岱妃’桃上都检测到CGRMV病毒, 在‘超红’桃上却没有检测到, 分析认为主要原因是‘超红’桃对其有较强的抗病性, 而CGRMV的高检出率也说明在本试验地有大量树体存在感染该病毒的可能性; ‘玉妃’桃上同时检测

到ACLSV和CGRMV两种病毒, 相对抗病性较弱。同时, 因为不同地区的病毒病发生情况跟苗木繁殖有很大关系, 一旦繁殖材料带有病毒, 就会加快桃树病毒病的传播蔓延, 所以使用无病毒繁殖材料和选择抗性强的桃树品种是预防桃病毒病的重要手段。目前, 检测样品的数量有限, 各主要病毒的分布情况还需进一步调查研究。下一步, 我们将检测桃脱毒组培苗的带毒情况, 优化脱毒及组培技术, 提高脱毒率, 为建立无毒桃繁殖体系和培育桃优良品种奠定基础。

植物组织中的病毒含量易受气候和寄主等因素的影响。牛飞庆(2012)在对青岛的‘日川白凤’桃研究时发现, 在3月份取样时能够检测到APCLSV, 而9月份又对同棵树进行采样检测时却未检测到该病毒。所以, 我们会对发病植株进行跟踪调查, 以研究田间桃不同品种的真实发病情况, 对于没有检测到特定病毒的桃树进行相应的保护措施, 以便为桃脱毒技术的开展提供实验数据。同时, 我们会进一步研究桃树不同部位的病毒含量与表现症状的关系, 以及不同品种间的抗病性的强弱, 为研究植株抗病毒机制提供基础。

参考文献

- 傅润民主编(1998). 果树无病毒苗与无病毒栽培技术. 北京: 中国农业出版社
- 李青, 覃兰英, 邓世秀(1993). 桃树的病毒病及脱毒苗培育. 北方果树, (3): 6~8
- 李世访, 卢美光(2013). 桃树病毒病研究现状与防控对策. 中国果业信息, 30 (10): 80~81
- 刘建, 杨莉莉(1999). 侵染桃树的病毒、类病毒和植原体病害研究进展. 果树科学, 16 (增刊): 27~31
- 卢美光, 吴冰, 高蕊, 张志想, 肖红, 陈冉冉, 李世访(2015). 我国部分地区樱桃病毒病害初步调查和病原检测. 植物保护, 41 (1): 98~103
- 牛飞庆(2012). 桃树上三种病毒的检测及序列分析[硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- 阮小凤, 周媛月, 马书尚, 杨勇(1998). 桃病毒病调查与检测研究. 西北农业学报, 7 (3): 59~62
- 王国平, 洪霓(1997). 我国果树病毒病发生危害现状与防治对策. 北方果树, (1): 8~10
- 于绍夫(1994). 核果类果树的主要病毒病害(续一). 落叶果树, (2): 41~45
- 于绍夫, 姜中武, 杨杰译(1992). 落叶果树的主要病毒病害. 北京: 农业出版社, 32~37
- 于云(2013). 多重RT-PCR技术检测桃病毒的研究[硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- 宗晓娟, 王文文, 王甲威, 魏海蓉, 严雪瑞, 刘庆忠(2012). SYBR Green I实时定量RT-PCR技术在甜樱桃病毒定量分析中的应用. 植物保护学报, 39 (6): 497~502
- Cembali T, Folwell RJ, Wandschneider P, Eastwell KC, Howell WE (2003). Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. *Crop Protect*, 22: 1149~1156
- Cui HG, Hong N, Xu WX, Zhou JF, Wang GP (2011). First report of *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* in stone fruit trees in China. *Plant Dis*, 95 (11): 1483
- Desvignes JC, Boye R (1998). Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. *Acta Hort*, 235: 31~38
- He Z, Jiang DM, Liu AQ, Sang LW, Li WF, Li SF (2011). The complete sequence of *Cymbidium mosaic virus* from *Vanilla fragrans* in Hainan, China. *Virus Gene*, 42: 440~443
- Lang G, Howell W, Ophardt D (1998). Sweet cherry rootstock/virus interactions. *Acta Hort* Sin, 468: 307~331
- Nemchinov L, Hadidi A, Foster JA, Chandresse T, Verderevskaya T (1995). Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Hort*, 386: 51~62
- Niu FQ, Pan S, Wu ZJ, Jiang DM, Li SF (2012). First report of *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infection of peach in China. *J Plant Pathol*, 94 (S4): 85~105
- Parakh DR, Shamloul AM, Hadidi A, Waterworth HE, Scott SW, Howell HE, Mink GI (1995). Detection of prune dwarf ilarvirus from infected stone fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Hort*, 386: 421~430
- Polák J, Svoboda J (2006). The reliability of detection and the distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pears in the Czech Republic. *Hort Sci*, 33: 7~10
- Ulubas C, Ertunc F (2005). Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques. *Turk J Agric*, 29: 251~257
- Wu YQ, Zhang DM, Chen SY, Wang XF, Wang WH (1998). Comparison of three ELISA methods for the detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus. *Acta Hort*, 472: 55~60
- Yu Y, Zhao Z, Jiang D, Wu Z, Li S (2013). A one-step multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses that infect peach. *Lett Appl Microbiol*, 57 (4): 350~355
- Zhang YP, Kirkpatrick BC, Smart CD, Uyemoto JK (1998). cDNA cloning and molecular characterization of cherry green ring mottle virus. *J Gen Virol*, 79: 2275~2281