

技 术 简 报

第 02 期

国家苹果产业技术体系

2018 年 1 月 31 日

苹果七种病毒的 RT-PCR 检测方法

病虫害防控研究室 王亚南 王树桐 曹克强

病毒病给苹果生产带来巨大危害，目前尚无有效防治药剂，繁育无毒苗木是最为有效的解决病毒病途径。建立准确、灵敏、快速的苹果病毒检测体系，是繁育无毒苗木的重要环节，也是我国实现苹果无毒栽培的重要技术支撑。

根据危害特点可将苹果病毒分为非潜隐性病毒 (Non-Latentvirus) 和潜隐性病毒 (Latentvirus) 两大类。文献表明，我国主要苹果病毒有 7 种，分别为：苹果锈果类病毒 (*Apple scar skin viroid*, ASSVd)、苹果凹果类病毒 (*Apple dimple fruit viroid*, ADFVd)、苹果花叶病毒 (*Apple mosaic virus*, ApMV)、苹果坏死花叶病毒 (*Apple necrotic mosaic virus*, ApNMV)、苹果茎痘病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV)、苹果茎沟病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV) 和苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV)，其中后三种为潜隐性病毒，在常规品种上不表现明显症状，前四种为非潜隐性病毒，常规品种上一般有明显症

状，但在一定环境条件下会出现隐症现象，因此，病毒的诊断须辅以分子检测。

一、7种主要苹果病毒的生物学特性

1、苹果锈果类病毒

ASSVd 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科 (*Pospiviroidae*)，是苹果锈果类病毒属 (*Apscaviroid*) 的代表成员。存在于植物细胞核内，有中央保守序列，不具核酶活性，非对称滚环复制。ASSVd 在苹果、梨、野生苹果、野生梨、桃、杏、樱桃和喜马拉雅野生樱桃上先后被报道。ASSVd 在苹果树上的症状主要呈现在果实上，症状类型主要取决于栽培品种和环境条件的变化，主要表现为五种病状：锈果型、花脸型、锈果-花脸型、环斑型和绿点型。ASSVd 在寄主的细胞核中复制积累，它可以在感病寄主的叶、茎、表皮、根茎以及果实的表皮、果肉和种子中检测到。Koganezawa 比较了 ASSVd 在不同的组织中的含量，发现 ASSVd 在树皮组织中含量最高。ASSVd 的主要传播途径有嫁接传播、修剪工具传播及种子传播。被这种类病毒侵染的果树将终生带毒，且目前尚无有效的防治药剂。

2、苹果凹果类病毒

ADFVd 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科 (*Pospiviroidae*)，是苹果锈果类病毒属 (*Apscaviroid*) 的代表成员。基因组大小约 306-307nt，具有苹果锈果类病毒属成员的典型中央保守区的准棒状结构，ADFVd 与 ASSVd 序列相似性达 63.5%。ADFVd 最初在意大利苹果上发现，造成畸形果并在红色果皮上伴有 3-4mm 直径的凹形绿色斑点，这些斑点通常造成果实萎缩并与下层果肉中的坏死部分相关，在一些苹果品种上的症状与 ASSVd 诱导的症状相似。

3、苹果花叶病毒

ApMV 在苹果上发生普遍，该病毒为等轴不稳环斑病毒属

(*Illarvirus*) 成员，病毒粒体为等轴对称二十面体的准等轴对称颗粒，直径为 26-35 nm。ApMV 为三分体基因组，每个病毒粒子包裹一条 RNA 核酸链 (RNA1 或 RNA2 或 RNA3 或 RNA4)，正义链 RNA、线性，每个 RNA 片段的 5' 端为甲基化帽子结构，3' 端既不是 poly(A)，也不是 tRNA 样结构，所有 RNA 的 3' 端折成稳定发卡结构，并含有 AUGC 盒。ApMV 危害寄主表现为叶片不均匀褪绿，形成黄绿相间的花叶，根据病斑形状和大小分为 5 种类型：斑驳型、花叶型、条斑型、环斑型、镶边型。叶片花叶严重影响苹果植株的光合作用，病树提早落叶，造成减产，果实不耐贮藏。ApMV 在世界各地广泛分布，西欧、东欧、美国、日本、中国等地均有报道。许多栽培品种对其表现敏感，如乔纳金、金冠等。国外的研究表明 ApMV 不仅可造成苹果的花叶，还能使感染品种的树体生长量减少 50%，树干直径减少 20%，苹果产量减少 30%；有文献报道 ApMV 侵染金冠、蛇果、麦金托什苹果，分别造成 46%、42%和 9%的减产。ApMV 目前未发现传播介体，主要通过受病毒侵染的砧木和接穗在嫁接过程中传播扩散，可能通过病株和健康株的自然根接传播，是否能通过种子和花粉传播尚不明确。

4、苹果坏死花叶病毒

2016 年 Hiroki Noda¹ 报道，引起苹果花叶症状的病原还包括 ApNMV，在我国苹果产区主要由 ApNMV 引起苹果花叶症状。该病毒与 ApMV 同属。具体生物学特性还不明确。

5、苹果茎痘病毒

ASPV 为凹陷病毒属 (*Foreavirus*) 的代表种，病毒粒体弯曲线状，螺旋对称结构，轴腔不清晰，螺旋结构模糊，直径为 12-15 nm，粒体长 800 nm。基因组核酸为正单链 RNA，线性，基因组由 9306 个核苷酸组成，5' 端有一段 33nt 非编码序列，最大的 ORF1 (34-6582nt) 编码 247 kDa 的复制相关蛋白，ORF2 (6685-7353 nt)、ORF3 (7358-7

717 nt)、ORF4 (7629 -7 838 nt) 分别编码 25、13 和 17 kDa 蛋白, 组成一个三基因盒, 可能参与细胞间的运动, ORF5 (7930-9 171nt) 编码 44 kDa 的外壳蛋白, 仅接着是一段 135 个核苷酸的非编码序列, 3' 末端具有 poly (A) 尾巴。ASPV 病树症状多不明显, 呈慢性危害。果树生长不良, 严重影响产量。在相应的指示植物上, 树皮内层及白色木质部产生褐色斑块。ASPV 的寄主范围较广, 木本寄主包括苹果、梨、樱桃和海棠等, 此外可人工接种多种木本和草本植物。鉴别寄主为西方烟、斯派 227、弗吉尼亚小苹果等。该病毒分布于美国、德国、意大利、日本、新西兰、非洲、瑞士、匈牙利、加拿大、澳大利亚、韩国以及中国等地。ASPV 目前尚未发现昆虫传播介体, 在木本寄主上均可通过嫁接传染, 在果园中, 病毒可能通过病、健树根系接触传播, 通过工具的交叉使用进行传播, 还可能通过汁液相互沾染进行传播, 不能通过种传和花粉传播。

6、苹果茎沟病毒

ASGV 属于发形病毒属 (*Capillovirus*), 病毒粒体为极弯曲线状, 有明显的纵横交叉带, 轴腔不清晰, 螺旋结构很清楚, 直径为 12 nm 左右, 粒体长 600-700 nm。基因组核酸为正单链 RNA, 线性, 基因组 6500 nt, 上游是一个 142 nt 的非编码区, 含 2 个重叠的 ORF、ORF1 (37- 6341nt) 编码 241 kDa 的多聚蛋白, 随后切割成甲基转移酶 (Mt)、类木瓜蛋白酶 (Ppro)、解旋酶 (Hel)、聚合酶 (Pol), 外壳蛋白在 C 端, ORF2 在 ORF1 内, 始于 4788 nt, 编码 36 kDa 的移动蛋白 (MP), 3' 末端具有 poly (A) 尾巴。该病毒侵染症状为顶端生长消弱, 嫁接部位树皮下的木质部有凹沟, 大部分吸收根死亡, 树势严重衰退。在相应的指示植物上木质部产生条沟。该病毒是苹果和梨上发生普遍的潜隐性病毒之一, 危害苹果、梨、柑橘、樱桃、杏等果树和百合, 其寄主有 20 种植物, 主要包括双子叶植物中的番

杏科、苋科、藜科、葫芦科、唇形科、豆科、蔷薇科、玄参科、茄科等。鉴别寄主为弗吉尼亚小苹果、昆诺藜、心叶烟及菜豆。该病毒在法国、意大利、美国、加拿大、中国、日本、韩国、南非、澳大利亚等国家均有分布。ASGV 在昆诺藜上可通过种子传播，在木本寄主上可通过嫁接传播，苹果上可机械传播，亦可通过汁液，摩擦接种感染草本寄主，无已知介体。

7、苹果褪绿叶斑病毒

ACLSV 为纤毛病毒属 (*Trichovirus*) 的代表成员，病毒粒体为弯曲线状，螺旋对称结构，直径 12nm，长约 720- 740 nm。基因组核酸为正单链 RNA，线性，大小 7555 nt，基因组含有 3 个互相重叠的开放阅读框，分别编码 216.5、50.4 和 21.4 kDa 蛋白，最大的 ORF 编码产物可能参与病毒复制，最小的蛋白为外壳蛋白。基因组 5' 端有帽子结构，3' 端有 poly (A) 尾。ACLSV 可侵染李、桃、樱桃、杏等核果类果树，此外还能侵染昆诺藜、苋色藜、灰藜、西方烟、白肋烟、菜豆、黄瓜、笋瓜、莴苣菜、千日红、苋菜和菠菜等 8 个科 15 种草本植物，寄主范围广泛，在世界各国都有发生。其鉴别寄主为苏俄苹果 (R12740~7A)、大果海棠、昆诺藜及苋色藜。英国、法国、德国、波兰、匈牙利、阿尔巴尼亚、黎巴嫩、约旦、土耳其、西班牙、智利、希腊、南斯拉夫、中国、日本、美国等国家均有报道。我国于 1989 年初次报道了苹果树上的 ACLSV。ACLSV 主要通过嫁接传播，机械接种可能传播，非种传，线虫能否传播至今未能确定。

二、七种主要苹果病毒的 RT-PCR 检测方案

建议春末、秋初采集果树根部或一年生、两年生枝皮进行七种主要苹果病毒的 RT-PCR 检测。样本采集后尽快进行 RNA 提取和检测，否则影响检测结果的准确性。样本采集后，在 4-25℃ 之间，以枝条形式报纸包裹保存，建议不要超过 3 天，-80℃ 可长期保存。

1、RNA 提取

使用组织破碎研磨仪将样品研磨至粉末之后，参照天根的 RNA prep pure Plant Kit (货号 DP432) 说明书提取植物 Total RNA。

2、cDNA 合成

两步法 cDNA 合成方法如下：

1) 冰上进行下列操作。

模板 RNA	3.0 μ L
随机引物 (20 pmol / μ L)	1.0 μ L
DEPC 水	2.0 μ L
<hr/>	
总体积	6.0 μ L

2) 70°C 保温 10 min, 冰上冷却 2 min。

3) 离心数秒。

4) 上述 Microtube 管中配置下列反转录体系。

上述	6.0 μ L
5×M-MLV Buffer	2.0 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	0.5 μ L
RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L)	0.25 μ L
M-MLV (200 U/ μ L)	0.5 μ L
DEPC 水	0.75 μ L
<hr/>	
总体积	10.0 μ L

5) 42°C 保温 1 h。

6) 70°C 灭活 15 min, 冰上冷却。

7) 离心数秒, -20°C 保存备用。

3、PCR

以上述合成的 cDNA 为模板, 按以下体系和程序扩增目的片段。

(1) 病毒特异性引物

名称	序列	产物大小 (bp)
ASPV-F	TGGAACCTCATGCTGCA	360
ASPV-R	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	
ASGV-F	GAGGATTTAGGTCCCTCTC	821
ASGV-R	GTATAAAGGCAGGCATGTCAACC	
ACLSV4-3'	GCAAATTCAGTCTGTAAAAG	566
ACLSV4-5'	GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACA	
ApMV-F	CAACCGAGAGGTTGGCA	161
ApMV-R	TTCTAGCAGGTCTTCATCGA	
ASSVdQxin3-3'	TTCGTCGACGACGACAGGTGA	332
ASSVdQxin3-5'	GGTGAGAAAGGAGCTGCCAG	
ApNMV-CP+1	CTTGCGTGCAATCGATATGG	600-700
ApNMV-CP-1	TCATCTCAACCTAGACATCC	
ADFVd32F	GAGGAAAACCTCCGTGTGGTTC	271
ADFVd68R	AAGTCCACTCCCTGCCAGACC	

(2) PCR 反应体系:

反应物	体积
cDNA	1 μ L
Mix (宝生物 RR901)	12.5 μ L
Primer-R (20 μ mol/L)	1 μ L
Primer-F (20 μ mol/L)	1 μ L
ddH ₂ O	9.5 μ L
总体积	25 μ L

注: Primer-R、Primer-F 分别对应指病毒特异性引物的 3'和 5'端。

(3) 反应程序:

苹果茎痘病毒 (ASPV) 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min

94 $^{\circ}$ C 30 s	}	35 个循环
56 $^{\circ}$ C 40s		
72 $^{\circ}$ C 45s		

终延伸 72 $^{\circ}$ C 8 min

苹果茎沟病毒 (ASGV) 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min

94 $^{\circ}$ C 1min	}	35 个循环
58 $^{\circ}$ C 1min		
72 $^{\circ}$ C 1min		

终延伸 72 $^{\circ}$ C 8 min

苹果褪绿叶斑病毒 (ACLSV) 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min

94°C 1min
50°C 1min
72°C 1min

} 35 个循环

终延伸 72°C 8 min

苹果花叶病毒 (ApMV) 反应程序: 94°C 预变性 5min

94°C 30 s
56°C 30s
72°C 30 s

} 35 个循环

终延伸 72°C 8 min

苹果锈果类病毒 (ASSVd) 反应程序: 94°C 预变性 5min

94°C 30 S
49.1°C 30 S
72°C 30S

} 35 个循环

终延伸 72°C 8 min

苹果坏死花叶病 (ApNMV) 反应程序: 94°C 预变性 5min

94°C 1min
45. °C 1min
72°C 1min

} 35 个循环

终延伸 72°C 8 min

苹果凹果类病毒 (ADFVd) 反应程序: 94°C 预变性 5min

94°C 30S
50°C 30S
72°C 30S

} 35 个循环

终延伸 72°C 8 min

4、琼脂糖凝胶电泳

检测时设阴、阳对照, 1.5%琼脂糖电泳, 上样量 5-8 μL, 110V

稳压电泳 45 min, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB 溶液染色 10 min, 凝胶成像系统照相记录。观察到与阳性对照相同的目的条带的样品为阳性, 带病毒; 与阴性对照一样, 未观察到目的条带的样品为阴性, 无病毒。

报送: 农业部科技教育司、农业部种植业管理司

发送: 各苹果主产省农业厅、各功能研究岗位专家、综合试验站站长

首席科学家办公室成员

国家苹果产业技术体系首席科学家办公室

2018 年 2 月 2 日印发
