

我国部分地区梅树病毒病的病原初步检测

王程安, 周俊, 陈梦婷, 崔西云, 高蕊,
肖红, 卢美光, 张志想*, 李世访*

(植物病虫害生物学国家重点实验室, 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要 梅是一种原产于中国、具有重要经济价值、花果兼用型的树种。在其生长繁育过程中易受病毒等病原侵袭, 从而可能造成严重的经济损失。目前我国梅树上病毒的发生及分布尚不清楚。为此, 对无锡、武汉、上海、杭州、南京的梅园进行了调查, 采集了 115 份样品, 其中发现了疑似病毒病害, 主要症状表现为花叶、卷叶、叶片皱缩、褪绿、脉间失绿等。RT-PCR 检测出了苹果茎沟病毒(ASGV)、樱桃病毒 A(CVA)和亚洲李属病毒 2(APV 2), 检出率分别为 30.4%、4.3%和 3.5%。此外, 克隆了这三种病毒的外壳蛋白基因序列, 同 GenBank 已登录的相应序列相似性为 86%~99% (核苷酸水平)和 83%~99% (氨基酸水平)。序列比较发现 APV2 梅分离物与日本梅分离物亲缘关系较近。

关键词 梅; 病毒; 苹果茎沟病毒; 樱桃病毒 A; 亚洲李属病毒 2

中图分类号: S 436.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017294

Preliminary detection of viruses in Japanese apricot trees in China

WANG Cheng'an, ZHOU Jun, CHEN Mengting, CUI Xiyun, GAO Rui,
XIAO Hong, LU Meiguang, ZHANG Zhixiang, LI Shifang

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Japanese apricot (*Prunus mume*) is an economically important fruit and ornamental plant, which originated in China. It is susceptible to different viruses. Viral infection may cause some severe diseases, resulting in significant economic losses. However, viruses infecting Japanese apricot in China are still unknown. Here, we carried out a large-scale survey of virus diseases of Japanese apricot in Wuxi, Wuhan, Shanghai, Hangzhou, and Nanjing in China. Suspected virus diseases were found in almost all Japanese apricot gardens. Symptoms mainly include leaf curl, vein clearing, and mosaic. A total of 115 leaf samples were collected in spring and early summer and were detected by RT-PCR using specific primers for *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Cherry virus A* (CVA), and *Asian Prunus virus 1, 2, 3* (APV1, APV2, APV3). The results showed that ASGV, CVA, and APV2 were positive with infection rate of 30.4%, 4.3%, and 3.5%, respectively. The amplified products were sequenced to verify the three viruses. The obtained sequences of ASGV, CVA, and APV2 shared 86%—99% nucleotide identity and 83%—99% amino acid identity with those deposited in GenBank. It was the first report of ASGV and APV2 in Japanese apricot in China. Furthermore, phylogenetic analysis showed that the isolated APV2 was closest to those isolated from Japan. Since the exchange of Japanese apricot propagation materials is frequent between China and Japan, APV2 may be transmitted through propagation materials between the two countries. The presence of ASGV, CVA, and APV2 means a potential threat to Japanese apricot industry. More attentions should be paid to virus diseases in Japanese apricot in China, and some actions should be taken to control the diseases.

Key words Japanese apricot (*Prunus mume*); viruses; *Apple stem grooving virus*; *Cherry virus A*; *Asian Prunus virus 2*

梅 *Prunus mume* Sieb. et Zucc. 原产于中国, 已有三千多年的栽培历史, 为花果兼用型树种, 具有较为重要的经济价值。梅广泛栽培于全国各地, 尤以

长江流域及西南地区为盛^[1]。中国不仅有丰富的梅品种资源, 是野生种质和栽培品种最多的国家, 而且是重要的梅产区^[2]。此外, 我国作为花梅的研究中

心,目前已围绕武汉、无锡、南京等地建立了梅花品种收集网络^[3]。

梅在生长繁育过程中易受多种病毒侵染,主要有苹果茎沟病毒 *Apple stem grooving virus* (ASGV)、樱桃病毒 *A Cherry virus A* (CVA)、亚洲李属病毒 *Asian prunus virus* 1, 2, 3 (APV1, APV2, APV3)^[4]。目前已报道的侵染梅的病毒大多发生在中国和日本。1990 年 Takahashi 等^[5]在日本的梅上检测到了 ASGV,值得指出的是,该梅是 1985 年由我国出口到日本的。Marais 等^[6]利用 RT-PCR 技术在我国江苏的梅上检出了 CVA,其分离物序列与杏分离物、欧洲李分离物、梅分离物以及樱桃分离物序列的相似性均在 90% 以上。APV 最早由 Hadidi 等^[7]在亚洲的李属种质资源上发现并命名为李属潜隐病毒 *Asian prunus latent virus* (APLV)。Marais 等基于基因组结构及序列分析认为 APV 属于乙型线性病毒科 *Betaflexiviridae* 中的凹陷病毒属 *Foveavirus*,并将其获得的 APV 分别命名为 APV1、APV2、APV3,并从日本的梅上检出了 APV1 和 APV2^[8-9]。2016 年 Marais 等^[10]利用高通量测序技术再次从日本的梅上检出了 APV1、APV2,并获得了 APV1 与 APV2 梅分离物的基因组全序列。目前,我国梅上病毒病害的发生和分布尚不清楚,而中国与日本之间梅种质资源交流频繁,病毒可能会通过繁殖材料进行传播。

已有研究表明 ASGV、CVA 与 APV 除侵染梅外,还可以侵染其他果树。ASGV 寄主范围广泛,主要危害苹果、梨、柑橘、樱桃等,在全国各地均有报道^[11]。CVA 主要侵染樱桃、桃、杏等李属植物,在环渤海湾地区、河南、云南、新疆等地均有检出^[12-14]。

目前国内有关 APV 的报道极少,仅在江苏的桃上检出 APV3^[10]。除 APV 外,ASGV 与 CVA 在我国的分布均较为广泛。

为了明确我国梅树上病毒病害的发生情况及相关病原,本研究开展了实地调查和 RT-PCR 检测。初步掌握了主要的几个梅园中疑似病毒病害的发生情况,并且明确了 ASGV、CVA 和 APV2 在我国梅树上的发生。该结果为进一步监测和控制梅上 ASGV、CVA 和 APV2 的传播和扩散提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

2014—2015 年,对无锡、武汉、上海、杭州以及南京梅园中病毒病害发生情况进行调查,采集有疑似病毒病害症状和无症状的梅花叶片共 115 份,记录发病症状并采集症状照片(图 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器

TRIzol RNA 提取试剂、DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 试剂公司;主要仪器包括 BIO-RAD My Cycler PCR 仪、KCBIO-2800 凝胶成像系统等。

1.1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中已登录的相应病毒 CP 基因序列设计 ASGV、APV1、APV2、APV3 的 RT-PCR 扩增引物 ASGV-CPu/d、APV1-CPu/d、APV2-CPu/d、APV3-CPu/d,并参考文献选择 ASGV、CVA 的 RT-PCR 扩增引物 ASGV-F/R、CVA-F/R(表 1)。引物由北京六合华大科技有限公司合成。

表 1 用于检测 5 种病毒的引物序列

Table 1 Specific primers used for five viruses detection

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	序列位置 Location	产物大小/bp Product size	退火温度/°C T _m	参考序列或文献 Reference
ASGV-F	CCCCTGTGTTGATTTGATACACCTC	5 870—5 894	524	60	[15]
ASGV-R	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	6 393—6 372			
CVA-F	TGTTGGGGCACAGTTTCAAG	6 051—6 071	1 184	55	[16]
CVA-R	TGATTGGTGACGGTGAAGGA	7 214—7 234			
ASGV-CPu	ATGAGTTTGAAGACGTGCTTCAGC	1—25	715	61	LN823991
ASGV-CPd	CCTAACCTCCAGTTCCAGTTACTTT	688—714			
APV1-CPu	ATGAGTACCTCTTCTGCAACAGTTGTT	2 039—2 065	1 206	58	DQ205236
APV1-CPd	TCAGTCCAGCTCCTTCCCTTTTAAGGT	3 218—3 244			
APV2-CPu	ATGACTACTTCTCAATCCACAGCAACT	337—364	1 203	58	DQ205237
APV2-CPd	TCAATCCATTTCCTTCCCTTCAACAA	1 513—1 539			
APV3-CPu	ATGACAACCTTCTGATTTGGCTGCCACA	205—231	1 227	58	DQ205238
APV3-CPd	CTAATCCATCTCCTTCCCTTCAAAAGT	1 405—1 431			

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

称取新鲜叶片 0.1 g, 采用改良 TRIzol 法提取总 RNA, 具体步骤参照文献[17]。

1.2.2 RT-PCR 检测

反转录体系: dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, 5 \times M-MLV buffer 2 μ L, M-MLV (200 U/ μ L) 和随机六聚引物 0.5 μ L, RNase inhibitor (40 U/ μ L) 0.25 μ L, RNA 模板 1 μ L, 用无菌双蒸水补足至 10 μ L, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中温育 1 h, 直接进行 PCR 或置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

PCR 检测体系: 2 \times Taq PCR Mastermix 10 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L (20 μ mol/L), 反转录产物 1 μ L, 用无菌双蒸水补足至 20 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, T_m 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR

产物用 1.5%~2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 凝胶成像仪采集结果。

1.2.3 PCR 产物克隆及测序

参照 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收纯化 PCR 扩增得到的目标产物, 分别连接至 pGEM-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 抗性筛选, 挑选单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 每种病毒每个样品分别挑选 2~4 个阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.2.4 序列分析

用 DNAMAN 进行比较分析, 并用 MEGA 6.0 进行相关序列系统进化树分析, 采用相邻法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 以重复 1 000 次的自展值来判断分支可靠性, 忽略自展值小于 75% 的数值。构建系统进化树所用到的各病毒分离物信息 (基因登录号、分离物名称、寄主、来源地及其参考文献) 见表 2。

表 2 用于 ASGV、CVA 和 APV2 梅分离物亲缘关系分析的国内外分离物

Table 2 Isolates of ASGV, CVA, APV2 for phylogenetic analysis

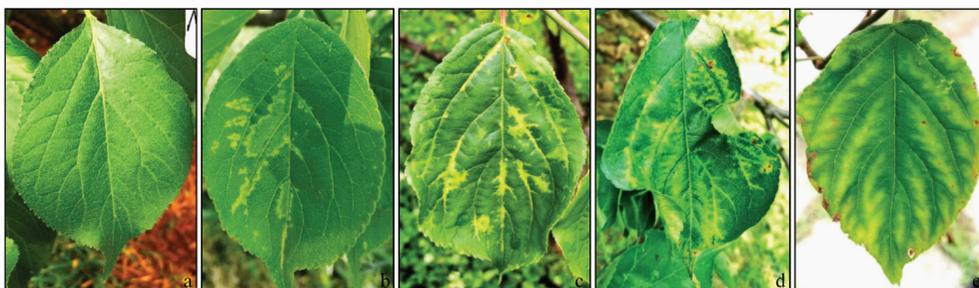
病毒名称 Virus name	登录号 GenBank no.	分离物名称 Isolate	寄主 Host	来源地 Geographic origin	参考文献 Reference
ASGV	KC588948.1	CTLV-MTH	柑橘	中国	无
	KF434636	T47	苹果	中国	[18]
	NC_001749.2	无	苹果	日本	[19]
	JN701424.1	HH	沙梨	中国	无
	JQ308181.1	ASGV-CHN	苹果	中国	[20]
	HE978837	ASGVp12	苹果	印度	[21]
	JX080201.1	AC	苹果	德国	[22]
	AY596172.1	ASGV-K	梨	韩国	[23]
	AB004063	无	百合	日本	[24]
	D16681.1	无	百合	日本	[25]
	EU553489	无	柠檬	美国	[26]
	FJ355920.1	LCd-NA-1	柑橘	中国台湾	无
	AY646511.1	Kumquat 1	猕猴桃	中国台湾	无
	KC588947.1	CTLV-XHC	柑橘	中国	无
	JQ765412.1	Shatang orange	柑橘	中国	无
CVA	HQ267857.1	V590	樱桃	法国	[27]
	FN669549.1	HPPSC	樱桃	印度	无
	FN669548.1	JKSPMi	樱桃	印度	[28]
	FN691959.1	JK	樱桃	印度	[28]
	FN669547.1	JKSNM	樱桃	印度	[28]
	AB181355.1	Vs2-1	樱桃	日本	无
	X82547.1	无	樱桃	英国	[29]
	KU131205.1	Taian	樱桃	中国	[30]
	HQ267856.1	PF	桃	法国	[31]
	APV2	KT893295.1	Bonsai	梅	日本
NC_028868.1		Bungo Q-1256-01	梅	日本	[10]
DQ205237.1		Bungo2 Q-1256-01	桃 GF305	日本	[8]
KT893297.1		Tatao25 Q-357-02	桃	中国	[10]
KR998049.1		APV_2_Q86	桃	美国	无
KR998048.1		APV2 Q65a	桃	美国	无

2 结果与分析

2.1 梅病毒病害初步调查

调查发现武汉、无锡、上海以及南京等地的梅园中均有疑似病毒病的发生,主要症状表现为花叶、叶片皱缩、卷叶、褪绿、脉间失绿等(图 1)。其中,南京梅园发病率最高,几乎每棵树都有疑似病毒病的症

状,主要表现为环斑、叶脉褪绿。其次是武汉梅园,发病率达 50%。该梅园中不同树龄植株上的症状表现不同。两三年生植株上花叶较为严重,甚至整株表现花叶,三年生以上的植株未发现疑似病毒病的症状,但落果较为严重。上述结果表明我国部分地区梅园中疑似病毒病的发生较为普遍与严重,有必要进行相关病毒的检测及鉴定。



a: 无症状叶片; b: 环纹; c: 叶片皱缩与明脉; d: 卷叶与明脉 e: 沿脉变色或脉带
a: Asymptomatic leaves; b: Ring line; c: Leaf shrink and vein cleaning; d: Leaf roll and vein cleaning; e: Vein-banding

图 1 供试梅样品上的症状

Fig. 1 Symptoms on *Prunus mume* leaf samples

2.2 梅主要病毒的 RT-PCR 检测

使用 RT-PCR 检测采集的 115 份梅树叶片上的 5 种主要病毒 ASGV、CVA、APV1、APV 2、APV3,结果仅检出 ASGV、CVA、APV2(图 2),未检出 APV1 和 APV3。ASGV 的检出率最高,达 30.4%; CVA 和 APV2 的检出率分别为 4.3% 与 3.5%(表 3)。其中,无锡梅园中 ASGV、CVA 和 APV2 的检出率分别为 56.7%、13.3% 与 6.7%。武汉梅园中 ASGV 检出率最高,达 77.8%;CVA 检出率为 5.5%,

未检出 APV2。上海梅园中 ASGV 和 APV2 的检出率分别为 18.8% 与 6.3%。杭州梅园中 ASGV 与 APV2 的检出率均为 14.3%。南京梅园中未检出这 5 种病毒(表 3)。此外,无锡梅园(2 个样品)和武汉梅园(1 个样品)的样品存在 ASGV 与 CVA 的混合侵染,杭州梅园发现 1 个样品存在 ASGV 与 APV2 的混合侵染。结合实地调查和 RT-PCR 检测结果,说明梅病毒病在我国普遍发生、分布广泛,且存在不同病毒混合侵染的现象。

表 3 梅树样品中三种病毒的检出率

Table 3 Detection rates of three viruses in *Prunus mume* samples in China

采样地点 Sampling site	样品数/份 Number of samples	ASGV		CVA		APV 2	
		阳性样品数/份 Number of positive samples	检出率/% Detection rate	阳性样品数/份 Number of positive samples	检出率/% Detection rate	阳性样品数/份 Number of positive samples	检出率/% Detection rate
无锡 Wuxi	30	17	56.7	4	13.3	2	6.7
武汉 Wuhan	18	14	77.8	1	5.5	0	0
上海 Shanghai	16	3	18.8	0	0	1	6.3
杭州 Hangzhou	7	1	14.3	0	0	1	14.3
南京 Nanjing	44	0	0	0	0	0	0
合计 Total	115	35	30.4	5	4.3	4	3.5

2.3 序列测定及比较分析

将 ASGV-CP、CVA-F/R、APV2-CP 扩增所得外壳蛋白(coat protein, CP)基因进行纯化、克隆和测序。其中获得 ASGV 与 CVA 的 CP 基因全长序列各 4 条,APV2 的 CP 基因全长序列 8 条,不同样

品间 ASGV、CVA 与 APV2 的序列相似性分别为 99.86%、99.92% 与 97.26%。并将本研究所得序列与 GenBank 中相关病毒的核苷酸序列及氨基酸序列进行对比。结果显示,获得的序列与相应参考序列在核苷酸水平上的相似性为 86%~99%,在氨基酸水

平上的相似性为 83%~99%，说明成功获得了 ASGV、CVA 与 APV2 的 CP 基因序列。此外，ASGV、CVA、APV2 每个阳性样品的克隆序列之间相似性较高(相似性>98.0%)，因此仅选取部分有代表性的序列登录 GenBank。ASGV、CVA、APV2 分别注册 1、1 与 4 条序列，获得登录号为 KY680265~KY680270。

2.4 系统进化树分析

对 ASGV、CVA、APV2 的 CP 基因的核苷酸序列进行系统进化树分析，结果显示，获得的 ASGV 梅分离物 HZ76(KY680265)与中国柑橘分离物(KC588948.1)的亲缘关系最近(图 2a)。CVA 梅分离物 WX20(KY680266)

与法国桃分离物 PF(HQ267856.1)在同一分支上，而明显区别于其他来自樱桃的分离物，说明 CVA WX20 与 PF 亲缘关系最近(图 2b)。获得的 3 个 APV2 梅分离物 WXGM(KY680267)、WX35(KY680268)、HZ78(KY680269)聚集在一起，与中国桃分离物 TaTao25、日本桃分离物 Bungo 2 以及日本梅分离物 Bungo 处于同一分组，说明这些分离物之间亲缘关系较近(图 2c)；而 APV2 梅分离物 SH85(KY680270)与日本梅分离物 Bonsai(KT893295.1)处于另一分组(图 2c)，说明 APV2 SH85 与 Bonsai 亲缘关系最近。

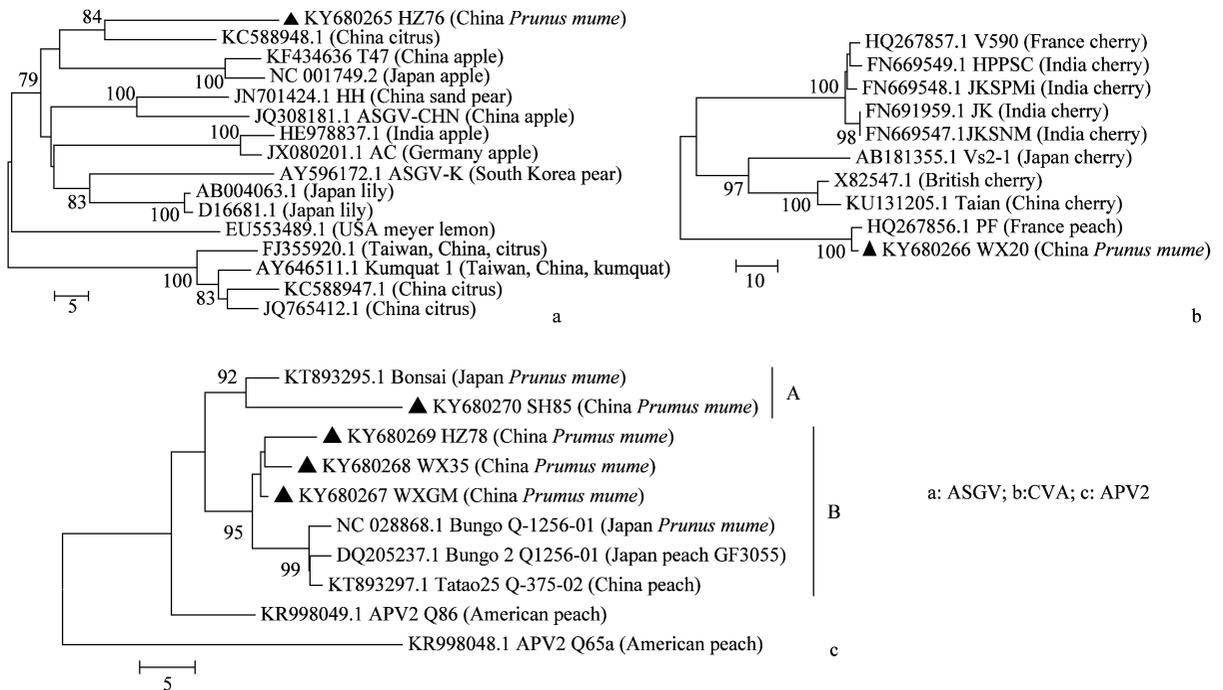


图 2 基于 ASGV、CVA、APV2 外壳蛋白基因的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of ASGV, CVA, APV2 based on coat protein gene sequence

3 讨论

本研究通过调查发现我国部分地区梅园中疑似病毒病的发生较为普遍与严重，利用 RT-PCR 技术检出了 ASGV、CVA 和 APV2，病毒总检出率达 38.26%，说明我国已有相当大的一部分梅感染了病毒。首次从国内的梅上检测到 ASGV 和 APV2。在无锡、武汉和杭州梅园中均检测到多种病毒复合侵染同一植株，这说明我国梅上病毒病的发生情况较为复杂，存在着多种病毒复合侵染的现象。此外 ASGV 检出率较高，且在无锡、武汉、上海和杭州梅园中均有检出，这应当引起必要的关注。南京样品中未检出这 3 种病毒。由于 RT-PCR 技术只能特异性检

测待检病毒，推测南京样品中可能存在其他病毒。因此，为进一步明确梅上是否存在其他病毒，将来有必要利用高通量测序等技术进行进一步检测和鉴定。

目前 ASGV、CVA 和 APV2 的侵染与症状之间的相关性尚不明确。由于 ASGV、CVA、APV 具有潜隐性^[32-34]，且本研究中存在多种病毒复合侵染的现象，因此观察到的症状与这 3 种病毒的相关性有待进一步研究确定，而且是否存在其他侵染梅的病毒仍需进一步深入研究。有研究发现梅上的 ASGV 与 APV2 分离物能在木本指示植物上引起相应症状。Takahashi 等^[5]将感染 ASGV 的梅的接芽嫁接到木本指示植物三叶海棠及弗吉尼亚小苹果上，结果发现三叶海棠接种点周围出现坏死，弗吉尼亚小

苹果植株上出现茎沟。APV2 梅分离物 Bonsai 接种桃 GF305 后,引起老叶畸形^[35]。CVA 单独侵染寄主后一般不表现症状,但与其他病毒复合侵染引起严重病害^[33]。本研究发现 ASGV 与 CVA 复合侵染的植株比 ASGV 或 CVA 单独一种侵染的植株症状表现严重,但观察到的症状是否由 ASGV、CVA 单独或复合侵染所致有待进一步研究。

繁殖材料的交换是病毒传播的重要途径之一。本研究发现中国 APV2 梅分离物与日本 APV2 梅分离物 Bonsai 亲缘关系最近。值得指出的是,中国与日本的梅品种资源数量相当,两国之间梅种质资源交流频繁,我国建立的梅花品种资源圃和全国果梅种质圃中保存了日本引进的梅品种^[36-38]。由此可推知,APV2 可能通过繁殖材料的引用在中国与日本之间扩散,并随着种植规模的扩大进一步蔓延。本研究结果虽然为 APV2 在中国和日本间的流行传播提供了线索,但仍缺乏直接证据的支持。

加强对我国梅的病毒病发生种类、分布和危害的调查,加强梅苗木在引种和调运过程中的病原检测工作,对控制我国梅病毒传播以及防治具有十分重要的意义。此外,中国作为梅的原产地,遗传种质资源丰富,有必要对不同梅品种对 ASGV、CVA 和 APV2 的抗性进行研究,以为抗病品种的培育提供可利用的资源。

参考文献

- [1] 陈俊愉. 中国梅花的研究 I. 梅之原产地与梅花栽培历史[J]. 园艺学报, 1962, 1(1): 69 - 78.
- [2] 汪敏, 陈瑞丹, 吴琼, 等. 入世背景下的中国梅发展之路[J]. 2003, 25(S2): 89 - 92.
- [3] 包满珠, 陈俊愉. 梅的研究现状及前景展望[J]. 北京林业大学学报, 1992, 14(S4): 74 - 82.
- [4] HADIDI A, BARBA M, CANDRESSE T, et al. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits[M]. St Paul, MN, USA: APS Press, 2011.
- [5] TAKAHASHI T, SAITO N, GOTO M, et al. *Apple stem grooving virus* isolated from Japanese apricot (*Prunus mume*) imported from China [J]. Research Bulletin of the Plant Protection Service, 1990, 26: 15 - 21.
- [6] MARAIS A, FAURE C, SVANELLA-DUMAS L, et al. First report of *Cherry virus A* in *Prunus mume* in China[J]. Plant Disease, 2008, 92(11): 1589 - 1589.
- [7] HADIDI A, LEVY L. Accurate identification of *Plum pox potyvirus* and its differentiation from *Asian prunus latent potyvirus* in *Prunus* germplasm [J]. EPPO Bulletin, 1994, 24: 633 - 643.
- [8] MARAIS A, SVANELLA-DUMAS L, FOISSAC X, et al. Asian prunus viruses; new related members of the family *Flexiviridae* in *Prunus* germplasm of Asian origin[J]. Virus Research, 2006, 120: 176 - 183.
- [9] MARINI D B, GIBSON P G, SCOTT S W. The complete nucleotide sequence of an isolate of *Asian prunus virus 1* from peach [*Prunus persica* (L.) Batch][J]. Archives of Virology, 2009, 154(8): 1375 - 1377.
- [10] MARAIS A, FAURE C, CANDRESSE T. New insights into *Asian prunus viruses* in the light of NGS-based full genome sequencing [J]. PLoS ONE, 2016, 11(1): e0146420.
- [11] 郑银英. 苹果茎沟病毒和褪绿叶斑病毒分子变异研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [12] 王文文, 李晓娟, 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.
- [13] 刘聪利, 李明, 赵改荣, 等. 河南甜樱桃病毒病害调查及病原检测[J]. 植物保护, 2016, 42(4): 200 - 204.
- [14] 周登攀, 郝小军, 向本春. 新疆石河子地区设施樱桃病毒病害调查及病原检测[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(4): 715 - 724.
- [15] 梁鹏博, 张志想, 刘斐, 等. 苹果花叶病病原鉴定中遇到的问题及其可能的病原探究[J]. 果树学报, 2016, 33(3): 332 - 339.
- [16] 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.
- [17] 张蔚. 辣椒中 PMMoV 的检测及枣树病毒的鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [18] CHEN Shanyi, YE Ting, HAO Lu, et al. Infection of apple by *Apple stem grooving virus* leads to extensive alterations in gene expression patterns but no disease symptoms[J]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e95239.
- [19] YOSHIKAWA N, SASAKI E, KATO M, et al. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome[J]. Virology, 1992, 191(1): 98 - 105.
- [20] ZHAO Lei, HAO Xing'an, LIU Ping, et al. Complete sequence of an *Apple stem grooving virus* (ASGV) isolate from China [J]. Virus Genes, 2012, 45(3): 596 - 9.
- [21] DHIR S, WALIA Y, ZAIDI A A, et al. A simplified strategy for studying the etiology of viral diseases: *Apple stem grooving virus* as a case study [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 213: 106 - 110.
- [22] LIEBENBERG A, MOURY B, SABATH N, et al. Molecular evolution of the genomic RNA of apple stem grooving capillovirus [J]. Journal of Molecular Evolution, 2012, 75(3/4): 92 - 101.
- [23] SHIM H, MIN Y, HONG S, et al. Nucleotide sequences of a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyri folia*)[J]. Molecules & Cells, 2004, 18(2): 192 - 199.
- [24] TERAUCHI H, MAGOME H, YOSHIKAWA N, et al. Nucleotide sequence of the genome of apple stem grooving capillovirus isolate and construction of an infectious cDNA clone of the genome containing a cauliflower mosaic virus 35S RNA

- [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1997, 63: 432-436.
- [25] OHIRA K, NAMBA S, ROZANOV M, et al. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes[J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76(9): 2305-2309.
- [26] TATINENI S, AFUNIAN M R, GOWDA S, et al. Characterization of the 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: evidence for a CP subgenomic RNA [J]. *Virology*, 2009, 385(2): 521-528.
- [27] MARAIS A, SVANELLA-DUMAS L, BARONE M, et al. Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of cherry capillovirus A [J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(1): 195-204.
- [28] NOORANI M S, AWASTHI P, SINGH R M, et al. Complete nucleotide sequence of *Cherry virus A* (CVA) infecting sweet cherry in India [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(12): 2079-2082.
- [29] JELKMANN W. Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry [J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76(8): 2015-2024.
- [30] WANG Jiawei, ZHAI Ying, LIU Weizhen, et al. Structure and genome organization of *Cherry virus A* (*Capillovirus*, *Betaflexiviridae*) from China using small RNA sequencing [J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(3): e00364-16.
- [31] MARAIS A, SVANELLA-DUMAS L, BARONE M, et al. Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of *Cherry capillovirus A* [J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(1): 195-204.
- [32] CHEN H, CHEN S, LI Y, et al. Phylogenetic analysis and recombination events in full genome sequences of *Apple stem grooving virus* [J]. *Acta Virologica*, 2013, 58(4): 309-316.
- [33] 陈立伟, 宗晓娟, 王文文, 等. 樱桃病毒 A 外壳蛋白基因克隆及其原核表达 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(13): 195-199.
- [34] HARI V, ABDEL-GHAFFAR M H, LEVY L, et al. *Asian prunus latent virus*: an unusual potyvirus detected in germplasm from East Asia [J]. *Acta Horticulturae*, 1995, 386: 78-85.
- [35] DESVIGNES J C, BOYE R, CORNAGGIA D, et al. *Virus diseases of fruit trees* [M]. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes (CTIFL), Paris, France, 1999.
- [36] 张毅. 日本垂枝梅花资源 [J]. *世界农业*, 2011(10): 90-94.
- [37] 褚孟妮. 中国果树志梅卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 1-47.
- [38] 李庆卫. 川滇藏黔野梅种质资源调查和梅花抗寒品种区域试验的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2009.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 148 页)

果实接种法基于同一辣椒品种的果实对疫病抗性的一致性,可每个品种选取 3 个果实作为试材进行初步筛选,经初步筛选后的材料再采取辣椒果实鉴定方法或其他鉴定方法进一步大量接种鉴定。采用果实接种法进行初步筛选,快速简便,操作简单,可同时筛选大量品种,有利于抗疫品种的快速筛选。

果实接种法以离体果实为研究对象,能够在短时间内检测多个品种,对辣椒植株无任何损伤,不影响植株的生长,辣椒原有植株可用于其他试验或取种。即使是感病品种,也能在进行抗疫病鉴定的同时保存品种资源,在对种质资源稀少的品种进行抗疫病鉴定方面有优势。另外,果实接种法鉴定在辣椒青果期的任何阶段都可以进行,试验周期短,试验时间充足。

果实接种法的缺点在于以离体的果实作为鉴定材料,不存在系统抗性反应。另外,滤纸的湿度要保持一致,避免湿度过大导致果实过度腐烂,影响病级判定。对于果实太小的品种,如圆球形的果实,也存在病级判定的问题。

参考文献

- [1] REIFSCHNEIDER F J B, BOITEUX L S, DELLAVECCHIA P T, et al. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper [J]. *Euphytica*, 1992, 62(1): 45-49.
- [2] 李智军, 龙卫平, 郑锦荣, 等. 辣椒疫病抗性离体叶鉴定法研究 [J]. *华南农业大学学报*, 2007, 28(2): 47-51.
- [3] 马辉刚, 何烈干, 陈学军, 等. 两种方法鉴定辣椒疫病抗性研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(3): 536-542.
- [4] KIM Y J, HWANG B K, PARK K W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici* [J]. *Plant Disease*, 1989, 73(9): 745-747.
- [5] MOZZETTI C, FERRARIS L, TAMIERRI G, et al. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, 46(2): 95-107.
- [6] KIM F S, HWANG B K. Virulence to Korea pepper cultivars of *Phytophthora capsici* from different geographic areas [J]. *Plant Disease*, 1992, 76(5): 486-489.
- [7] 林柏青, 张松林. 辣椒品种抗疫病鉴定方法的初步研究 [J]. *中国蔬菜*, 1994(4): 21-24.
- [8] 毛爱军, 胡洽, 耿三省. 辣椒疫病菌接种鉴定技术研究 [J]. *北京农业科学*, 1998, 16(2): 21-24.

(责任编辑: 杨明丽)