

涂小云,董小艳,郭春梅,等.多重 RT-PCR 检测蝴蝶兰 3 种病毒 CymMV、ORSV 和 CMV[J].江苏农业科学,2017,45(5):91-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.024

多重 RT-PCR 检测蝴蝶兰 3 种病毒 CymMV、ORSV 和 CMV

涂小云¹,董小艳²,郭春梅¹,何俊平¹,鲍恩亚³

(1.江苏省连云港振兴花卉有限公司,江苏连云港 222002;2.江苏省连云港振兴农业发展集团有限公司,江苏连云港 222002;

3.江苏省连云港市房发园园林绿化工程有限公司,江苏连云港 222002)

摘要:根据建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)、齿兰轮斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)和黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV)3 种病毒外壳蛋白基因序列保守序列设计特异性引物,以病毒侵染的蝴蝶兰总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行扩增,建立了三重 RT-PCR 同时检测该 3 种病毒的方法。CymMV、ORSV 和 CMV 3 种病毒特异扩增的片段分别为 561、433、306 bp。用该方法对 17 个疑似病毒感染的蝴蝶兰样品进行检测,结果 13 个材料检测出 CymMV 特异带,2 个材料检测出 ORSV 病毒特异带,1 个材料检测出 CMV 病毒特异带,1 个材料同时检测出 CymMV 和 ORSV 病毒 2 条特异带,所检测的 17 个蝴蝶兰材料未发现 3 种病毒复合侵染的情况。

关键词:蝴蝶兰;多重 RT-PCR;建兰花叶病毒;齿兰轮斑病毒;黄瓜花叶病毒;检测方法

中图分类号: S436.8⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0091-02

兰花是一种高价值的观赏花卉,但一旦感染病毒,其观赏价值和经济价值将受到严重影响。近年来,随着兰花国内外贸易和种质交流频率的增加,兰花病毒病的发生有蔓延趋势。目前,至少有 28 种病毒可感染兰科植物,其中我国兰科植物感染的病毒以建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)、齿兰轮斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)为主,且这 2 种病毒复合感染占多数,也有少数蝴蝶兰感染黄瓜花叶病毒(*cucumber mosaic virus*, CMV)^[1]。CymMV 和 ORSV 主要借助机械性伤口进行传播,CMV 可借汁液传染,也可通过蚜虫传播。这 3 种病毒病感染兰花后可迅速扩散,且无有效防治药剂;因此,有必要建立多种病毒的高效检测方法,尽早检出感病植株并实施销毁,避免兰园大面积受损。

目前检测植物体内病毒的主要方法有电镜法、血清学鉴定和 PCR 技术等。其中 PCR 技术,尤其是多重 PCR,具有快速、便捷、灵敏度高和特异性强等显著优点,现已广泛用于病原微生物的检测。多重 PCR 是在同一反应体系中,利用一对或多对引物同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应,比普通单重 PCR 更为高效、经济和简便。郑轩等在一个 PCR 体系中成功对 5 种病毒复合侵染的烟草材料进行多重扩增,建立了能同时检测烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草蚀纹病毒、马铃薯 Y 病毒和烟草脉带花叶病毒的多重 PCR 检测体系^[2]。张威等^[3]和罗文彬等^[4]分别建立了可同时检测马铃薯 3 种病毒和 5 种病毒的多重 PCR 方法。

多重 PCR 在兰花病毒检测的利用主要集中于 CymMV 和 ORSV 的双重检测^[5-9],如郑国华等利用 2 对特异引物在同

一个 PCR 反应体系进行扩增的方法,建立了二温式多重 RT-PCR 同时检测 CymMV 和 ORSV 2 种病毒的方法^[8];章鹏程等利用 1 对简并引物,通过一步式 IC-RT-PCR 可以同时检测 CymMV 和 ORSV 复合感染情况^[10]。凤仙花坏死斑病毒(*impatiens necrotic spot virus*, INSV)和 CymMV 2 种病毒也可以通过双重 RT-PCR 同时检测^[11]。樊荣辉等通过优化三重 PCR 反应条件,一次扩增能同时检测文心兰 CymMV、ORSV 和菜豆黄花叶病毒(*bean yellow mosaic virus*, BYMV)的特异片段^[12]。CymMV、ORSV 和兰花斑点病毒(*orchid fleck virus*, OFV)的三重 PCR 检测体系最近也已有报道^[13]。但 CymMV、ORSV 和 CMV 的三重 PCR 检测体系目前还未见报道。本研究根据 CymMV、ORSV 和 CMV 外壳蛋白基因序列保守区域设计特异性引物,建立了三重 RT-PCR 检测该 3 种病毒的方法,可准确快速、简便、经济地检测出蝴蝶兰带毒情况,为尽早发现、消除病害,减少经济损失提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

CymMV、ORSV 和 CMV 3 种病毒 2013 年采自江苏省连云港振兴实业集团有限公司的兰花基地。其他供试蝴蝶兰材料来源于连云港当地花卉市场。

1.2 引物设计

根据 NCBI/GenBank 数据库中 CymMV、ORSV 和 CMV 外壳蛋白基因的保守序列,利用 NCBI/Primer-BLAST 程序设计特异 PCR 引物,其中 CymMV 上游引物为 CymMV-F 5'-CCGGTCACCTCATCAATCGCCA-3',下游引物为 CymMV-R 5'-TGCAGGCAGAGCATAGAGGGTG-3',扩增产物为 561 bp;ORSV 上游引物为 ORSV-F 5'-ATTTAAGCTCG-GCTTGGGCT-3',下游引物为 ORSV-R 为 5'-GTCTG-GACTTACTTGGACCTC-3',扩增产物为 433 bp;CMV 上游引

收稿日期:2015-12-28

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)2015]。

作者简介:涂小云(1971—),男,江西靖安人,高级农艺师,主要从事花卉遗传和栽培技术研究。E-mail:574037630@qq.com。

物为 CMV - F (5' - ACCGTGTGGGTTACAGTTCGGA - 3'), 下游引物为 CMV - R (5' - CACGGACTAAGTCGGGAGCATC - 3'), 扩增产物为 306 bp。

1.3 cDNA 获取

取蝴蝶兰新鲜叶片,液氮研磨成粉状,用 Trizol RNA 试剂盒提取叶片总 RNA,然后用 Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 将 RNA 反转录为 cDNA 第一链,随即保存于 -20 ℃ 备用。所有操作均按试剂盒说明书进行。

1.4 单重 RT-PCR 确定产物的特异性

采用 Vazyme Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,20 μL 反应体系的组成如下:2 × Vazyme mix buffer 10.0 μL,10 μmol/L 上游引物和下游引物各 1.0 μL,cDNA 模板 1.0 μL,无菌水 7 μL。PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 3 min;93 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

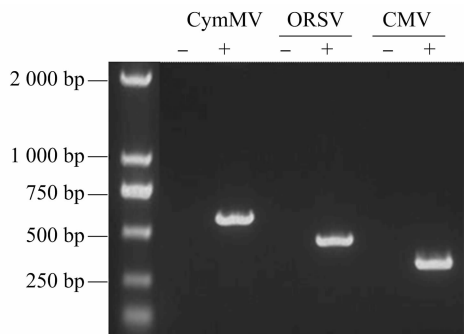
1.5 多重 RT-PCR 检测的建立

在单重 PCR 基础上,将上述 3 种 cDNA 模板等量混合,保持其他条件不变,分别对模板浓度、退火温度、引物浓度和循环参数进行优化,最后确定多重 PCR 最优反应体系。采用 Vazyme Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,20 μL 反应体系的组成如下:2 × Vazyme mix Buffer 10.0 μL,10 μmol/L CymMV 上游引物和下游引物各 0.8 μL,10 μmol/L ORSV 上游引物和下游引物各 0.8 μL,10 μmol/L CMV 上游引物和下游引物各 0.5 μL,稀释 10 倍的 cDNA 模板 1.0 μL,无菌水 4.8 μL。PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 3 min;93 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 单重 RT-PCR 检测体系

分别单独采用 1 对引物对获得的蝴蝶兰 cDNA 样品进行 PCR 扩增,3 对引物均能在相对于的样品中获得预期大小的扩增产物(扩增产物分别为 561、433、306 bp),电泳呈单一明亮条带(图 1),阴性水对照没有阳性条带,表明检测结果是特异性的,适合用于病毒检测。



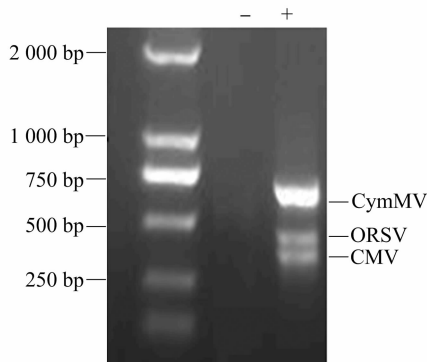
“-”为阴性水对照,“+”为携带相应病毒的蝴蝶兰 cDNA 样品

图1 单重 RT-PCR 确定引物特异性扩增

2.2 三重 RT-PCR 检测体系

扩增 CymMV、ORSV 和 CMV 的 3 对引物按等量浓度混合,对蝴蝶兰 cDNA 混合样品进行扩增,效果不理想。经过系列优化后,扩增 CymMV、ORSV 和 CMV 的 3 对引物的浓度比

例为 CymMV : ORSV : CMV = 1.6 : 1.6 : 1,蝴蝶兰 cDNA 混合样品稀释 10 倍,可以在同一个 PCR 反应体系中成功扩增出 3 个病毒 CP 基因的特异序列片段(图 2)

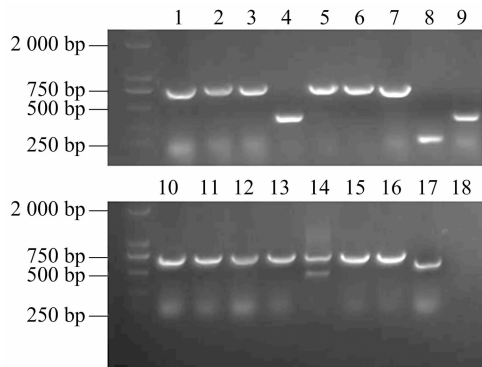


“-”为阴性水对照,“+”为携带病毒的蝴蝶兰 cDNA 混合样品

图2 多重 RT-PCR 确定引物特异性扩增

2.3 三重 RT-PCR 检测的应用

利用优化后 RT-PCR 体系,检测疑似病毒侵染的 17 个蝴蝶兰材料,结果如图 3 所示:13 个(1~3、5~7、10~13、15~17)材料检测出 CymMV 特异带,2 个(4、9 号)材料检测出 ORSV 病毒特异带,1 个(8 号)材料检测出 CMV 病毒特异带,阴性水对照(18 号)无 CymMV、ORSV 或 CMV 特异带。所检测的 17 个蝴蝶兰材料未发现 3 种病毒复合侵染的情况。



1~17—疑似病毒侵染的蝴蝶兰材料,18—水阴性对照

图3 多重 RT-PCR 检测蝴蝶兰病毒

3 讨论

普通单重 RT-PCR 可以对单一病毒进行有效检测,但 CymMV、ORSV 等病毒广泛分布于世界各地商业生产的兰花中,感染 30 多种兰属花卉,且这些病毒还易于形成复合侵染,严重降低兰花的商业价值^[14]。同时检测 2 种或多种主要兰花病毒的双重或多重 PCR 技术已有多个成功的报道,它们可以降低检测成本,缩短病毒检测时间,提高检测效率,包括针对 CymMV 和 ORSV 的双重 PCR 检测^[5-10],针对 INSV 和 CymMV 双重 PCR 检测^[11],针对 CymMV、ORSV 和 BYMV 的三重检测^[12],针对 CymMV、ORSV 和 OFV 的三重 PCR 检测体系^[13]等。对于病毒的检测,并非所有的病毒都可以用同一种方法检测,也没有一种方法可以检测出所有的病毒,应根据所研究的病毒特性及具体的试验条件、科研水平和操作人员的技术水平选用合适的方法。本研究针对蝴蝶兰 CymMV、

钱忠海,洪素娣,沈迎春,等. 3 种药剂防治薤菜田斜纹夜蛾药效比较和残留分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):93-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.025

3 种药剂防治薤菜田斜纹夜蛾 药效比较和残留分析

钱忠海¹,洪素娣²,沈迎春¹,黄建华²,睦丹²,史金剑²,徐炜枫³

(1. 江苏省农药检定所,江苏南京 210036; 2. 江苏省丹阳市植保植检站,江苏丹阳 212300; 3. 江苏省农产品质量检测中心,江苏南京 210036)

摘要:为指导薤菜田间斜纹夜蛾的科学防治,保障农产品质量安全,采用田间试验的方法,对斜纹夜蛾核型多角体病毒、茼虫威和虫酰肼开展田间药效试验与最终残留验证试验。田间药效试验结果表明,20% 虫酰肼悬浮剂 2 000 倍液、1 200 倍液对薤菜田斜纹夜蛾具有较理想的防治效果,持效期可达 15 d 左右,且对作物安全,可以大面积推广使用。残留验证结果表明,30% 茼虫威水分散粒剂的 2 种浓度药剂喷施田间,薤菜收获后有少量残留,但远低于国家限量标准,20% 虫酰肼悬浮剂的 2 种浓度药剂喷施田间未检测到农药残留。200 亿 PIB/g 斜纹夜蛾核型多角体病毒在薤菜上也有较好的防治效果,但其持效期较短,一般药后 7 d 左右要进行第 2 次防治,但由于其是生物农药,建议在绿色蔬菜基地使用。

关键词:薤菜;斜纹夜蛾;药效比较;残留分析

中图分类号: S433.4;S482.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0093-03

斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)属鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae),为间歇性暴发的暴食性害虫^[1-3],已知寄主范围多于 109 科 389 种^[4],在蔬菜上主要危害十字花科、茄科、豆

类、瓜类、菠菜、薤菜、芋等蔬菜^[1]。斜纹夜蛾属世界性分布的害虫,在热带和亚热带地区种群数量大,常年发生危害,给农业生产造成巨大的经济损失。在国内各地均有分布,是我国农业生产上的主要害虫之一,多次造成灾害性危害。斜纹夜蛾具有很强的繁殖力,平均每头雌虫可产卵 800 粒左右^[5],其幼虫共 6 个龄期,3 龄后进食量大增,危害较大^[6-7]。近年来,斜纹夜蛾在各地发生的频率明显提高^[8-9],呈上升趋势^[10]。化学农药的长期不合理使用,导致斜纹夜蛾的抗药性逐渐增强,防治难度加大^[11-12]。目前,斜纹夜蛾对有机磷、聚酯等多种杀虫剂都产生了不同程度的抗药性^[11,13-14]。

收稿日期:2016-01-08

基金项目:2015 年江苏省特经作物安全用药筛选项目。

作者简介:钱忠海(1981—),男,江苏泰州人,硕士,高级农艺师,研究方向为农药应用技术。E-mail:75414800@qq.com。

通信作者:沈迎春,硕士,研究员,主要从事农药登记管理和农药应用技术研究。E-mail:515512896@qq.com。

ORSV 和 CMV 3 种病毒,成功建立了 RT-PCR 三重检测技术,该项技术的关键是要选用合适的引物,在保证引物特异性的前提下,避免引物之间的互作干扰。本研究中所涉及 3 种病毒外壳蛋白基因序列同源性较高,因而用 PCR 方法对其进行检测可获得较稳定可靠的结果。

参考文献:

- [1] 苏俊明,张友强. 蝴蝶兰病毒病发生与防治(二)[N]. 中国花卉报,2008-05-24(003).
- [2] 郑轩,成巨龙,赵震,等. 五种烟草病毒 TMV、CMV、TEV、PVY 及 TVBMV 的多重 RT-PCR 同步检测[J]. 植物病理学报,2011,41(2):146-153.
- [3] 张威,白艳菊,范国权,等. 应用三重 RT-PCR 技术检测三种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯,2015(3):162-166.
- [4] 罗文彬,李华伟,汤浩,等. 马铃薯 5 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报,2015,42(2):280-288.
- [5] 曾燕君,莫饶,刘志昕,等. 兰花两种主要病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江西农业学报,2009,21(7):12-14.
- [6] 张妙彬,潘丽晶,肖杨,等. 双重 RT-PCR 同时检测兰花两种主要病毒的研究[J]. 广东农业科学,2010,37(5):166-

167,180.

- [7] 闻伟刚,谭钟,崔俊霞. 实时荧光 RT-PCR 方法检测齿兰环斑病毒与建兰花叶病毒[J]. 植物保护,2009,35(4):101-104.
- [8] 郑国华,明艳林,林德钦,等. 二温式多重 RT-PCR 同时检测两种主要兰花病毒的研究[J]. 植物保护,2007,33(2):113-115.
- [9] 周国辉,陈晓琴,李梅辉,等. 双重一步法 RT-PCR 同时检测兰花上的两种主要病毒[J]. 农业生物技术学报,2004,12(6):743-744.
- [10] 章鹏程,陈芝娟,杨科府,等. 一步式 IC-RT-PCR 同时检测 2 种兰花病毒的探讨[J]. 浙江农业科学,2012(8):1165-1168.
- [11] 丁元明,张巧萍,王云月,等. 兰花上凤仙花环死斑病毒和建兰花叶病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫,2009,23(4):32-33.
- [12] 樊荣辉,黄敏玲,钟淮钦,等. 文心兰 3 种主要病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立[J]. 福建农业学报,2015(7):697-700.
- [13] Ali R, Dann A, Cross P, et al. Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids[J]. Archives of Virology, 2014,159(11):3095-3099.
- [14] 万晴姣,李欲轲,马骏,等. 贵州齿兰环斑病毒的分子鉴定[J]. 贵州农业科学,2014(8):96-98.