冯黎霞,何瑞芳,左然玲,等. 进境菠菜种子携带菠菜潜隐病毒的检测与鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):121 – 123.
doi:10.15889/j. issn. 1002 – 1302. 2020. 09. 023

进境菠菜种子携带菠菜潜隐病毒的检测与鉴定

冯黎霞[1], 何瑞芳[1], 左然玲[2], 何日荣[1], 武目涛[1], 胡学难[1]
(1. 广州海关技术中心,广东广州 510623; 2. 黄埔海关技术中心,广东广州 510730)

摘要:以进境的菠菜种子为试验材料,采用特异性引物逆转录 PCR(RT – PCR)检测鉴定菠菜潜隐病毒(SpLV),并对扩增得到的特异性片段进行进一步测序验证。结果表明,采用的 3 对引物分别扩增得到了 3 种不同大小的特异性片段,其中引物对 SpLV – RNA2 – F/R 扩增的 RNA2 组分产物量最大,条带清晰,最适合日常 SpLV 的检测鉴定,目的条带测序结果与 GenBank 发布的菠菜潜隐病毒分离物的同源性为 97. 87% ~ 100. 00%,进一步说明进境菠菜种子感染了菠菜潜隐病毒。这是我国首次从进境菠菜种子上截获菠菜潜隐病毒。

关键词:菠菜潜隐病毒;RT – PCR;菠菜;检测
中图分类号: S41 – 31　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2020)09 – 0121 – 02

菠菜(*Spinacia oleracea* L.)是中国普遍栽培的蔬菜之一。菠菜潜隐病毒(Spinach latent virus, SpLV)是菠菜上重要的种传病毒病害,曾用名为 GE36,属雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)。SpLV 基因组结构为单链正义五分体 RNA,必需有 3 个大的组分(RNA1、RNA2、RNA3)及 1 ~ 2 个小的组分(RNA4、RNA5)或外壳蛋白一起才能完成侵染过程,主要侵染菠菜、番茄、藜麦、甜菜、鸡冠花、黄瓜、克利夫兰烟、黏毛烟、黄花烟、菜豆等,SpLV 存活期长,至少可以在菠菜、藜麦种子中存活 5 年,远距离传播主要依靠种子[1-2]。SpLV 目前主要分布在丹麦、芬兰、瑞典、挪威、南斯拉夫、新西兰、克罗地亚、美国、日本等国家或地区[3-6],我国没有分布,也没有截获的任何报道。

本研究以进境的菠菜种子为材料,应用一步法逆转录 PCR(RT – PCR)技术对 SpLV 进行检测鉴定。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

1.1.1　材料　受检材料为 2019 年 3 月广州海关检验检疫技术中心植检室接收的进境的菠菜种子。

收稿日期:2019 – 05 – 05
基金项目:广州市科技计划(编号:201604046002)。
作者简介:冯黎霞(1977—),女,山东鄄城人,博士,高级农艺师,主要从事进出境植物有害生物检验鉴定研究。E – mail: fenglx@iqtc. cn。
通信作者:胡学难,博士,研究员,主要从事进出境植物有害生物检验鉴定研究。Tel:(020)38290653;E – mail:huxn@ iqtc. cn。

1.1.2　试剂　核酸提取试剂 TRIzol 为 Invitrogen 公司产品;RT – PCR 一步法试剂盒(PrimeScript™ One Step RT – PCR Kit)、DNA Marker 2000 购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3　引物　SpLV RNA1 组分引物SpLV – RNA1 – F/R 序列:5′ – TGTGGATTGGTGGTTGGA – 3′,5′ – CTTGCTTGAGGAGAGATGTTG – 3′; RNA2 组分引物 SpLV – RNA2 – F/R 序列:5′ – GAACCACCGAAACCGAAA – 3′,5′ – CCACCTCAACACCAGTCATAG – 3′; RNA3 组分引物 SpLV – RNA3 – F/R 序列:5′ – GCCTTCATCTTTGCCTTTG – 3′,5′ – CATTTCATCTGCGGTGGT – 3′;预期扩增产物大小分别为 722、436、213 bp[4],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2　方法

1.2.1　样品 RNA 的提取　随机取样并称取 50 g 菠菜种子,研磨成粉末状,称取 0. 1 g 移入灭菌的 2 mL 离心管中,加入 1 mL 的 TRIzol 试剂,剧烈振荡摇匀,室温静置 3 min;4 ℃、12 000 *g* 离心 10 min,取上清;加入 200 μL 三氯甲烷,上下颠倒混匀,室温静置 3 min;4 ℃、12 000 *g* 离心 10 min,取上层水相;加等体积的异丙醇,颠倒混匀;4 ℃、12 000 *g* 离心 10 min,弃上清;加 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,4 ℃、7 500 *g* 离心 5 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 50 μL 无 RNA 酶的 ddH_2O, – 20 ℃保存备用。

1.2.2　RT – PCR 扩增　利用一步法 RT – PCR 试剂盒,针对 SpLV 的 3 个不同组分进行 RT – PCR 一步法检测,扩增体系如下: PrimeScript One Step

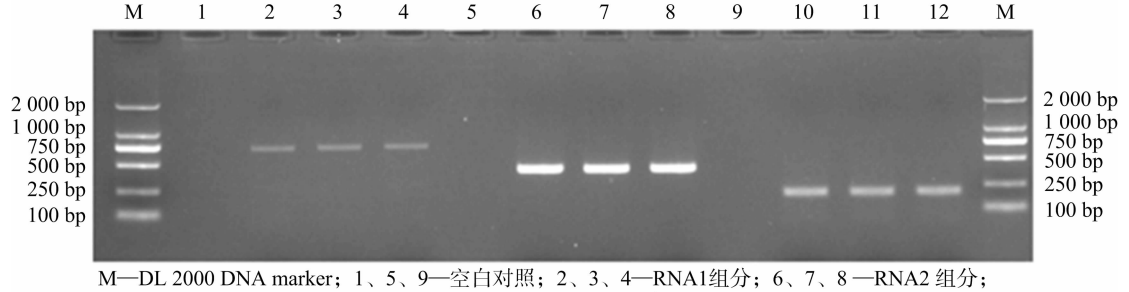
Buffer 25 μL，上下游引物各（20 μmol/L）1 μL，Prime Script 1 Step Enzyme Mix 2 μL，最后加 RNase Free H_2O 至总体积为 50 μL。反应参数如下：50 ℃ 30 min；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，35 个循环；72 ℃10 min。

1.2.3　PCR 产物的检测　RT－PCR 反应结束后，取 5 μL 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并记录结果。PCR 产物由广州天一辉远基因科技有限公司纯化并测序。

2　结果与分析

2.1　RT－PCR 扩增结果与分析

利用引物对 SpLV－RNA1－F/R、SpLV－RNA2－F/R、SpLV－RNA3－F/R 对菠菜种子中 SpLV 的 3 个组分进行一步法 RT－PCR 检测鉴定。结果显示，从待检测样品中分别扩增出 3 条特异性条带，大小分别为 722、436、213 bp，与预期片段大小相符（图 1），初步判断待测样品可能感染了 SpLV，在底物和



M—DL 2000 DNA marker；1、5、9—空白对照；2、3、4—RNA1组分；6、7、8—RNA2 组分；10、11、12—RNA3 组分

图1　菠菜种子中 SpLV 的 3 个组分的 RT-PCR 检测结果

引物浓度完全一致的情况下，获得的 RNA2 组分扩增产物的浓度明显比 RNA1、RNA3 高。

2.2　序列分析

产物核苷酸序列测序拼接后可知，扩增的目的片段大小分别为 722、436、213 bp，在美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，简称 NCBI）网站进行核酸序列 Blast。结果表明，其中 722 bp 核苷酸片段与分离物 SRP059420 RNA1 组分（GenBank 登录号：KY695012.1）核苷酸序列的同源性为 99.72%，与美国分离物（GenBank 登录号：U93192.1）核苷酸序列的同源性为 99.58%，与番茄分离物（GenBank 登录号：DQ457000.1）核苷酸序列的同源性为 97.87%；436 bp 核苷酸片段与分离物 SRP059420 RNA2 组分（GenBank 登录号：KY695013.1）核苷酸序列的同源性为 100.00%，与美国分离物（GenBank 登录号：U93193.1）核苷酸序列的同源性为 99.77%；213 bp 核苷酸片段与分离物 SRP059420（KY695014.1）和菠菜分离物（GenBank 登录号：U93194.1）RNA3 组分核苷酸序列同源性均为 100.00%。进一步验证得出，3 个不同大小的 RT－PCR 产物均为 SpLV 的特异性产物。

3　结论与讨论

菠菜潜隐病毒为五分体病毒，本研究为确定 RT－PCR 扩增到的产物为目标病毒，利用特异性引物对 SpLV 侵染所需要的 3 个组分（RNA1、RNA2、RNA3）分别进行扩增，在扩增条件完全一致的情况下，引物对 SpLV－RNA2－F/R 扩增的 RNA2 组分产物量最大，条带清晰，更适合日常 SpLV 的检测鉴定。

菠菜种子被植物病毒感染后，种子的品质下降，发芽率降低，芽苗生长势减弱，更易被其他病害侵染。SpLV 随种子传毒的效率非常高，在藜麦和菠菜上种传率超过 50%，在烟叶上超过 90%[1]。韩国曾多次从输韩菠菜种子上截获 SpLV，并在 2007 年把该病毒列入输韩植物和植物产品检疫性有害生物名录。此次在菠菜种子上截获菠菜潜隐病毒，保护了我国蔬菜种植业的安全，为防止该病毒的传入，广州海关对该批菠菜种子作退运处理。但是由于有害生物分布的非均匀性以及种子带毒率的非一致性，入境第一口岸能否检出有害生物以便识别风险，这是一个概率事件，而不是百分之百能够检出有害生物的必然事件。因此国外预检及入境后的监管、监测及跟踪检疫更为重要。

参考文献：

[1] Bos L，Huttinga H，Maat D Z. Spinach latent virus，a new ilarvirus seed－borne in *Spinacia oleracea*[J]. Journal of Plant Pathology，1980，86(2)：79－98.

[2] Ge X，Scott S W，Zimmerman M T. The complete sequence of the genomic RNAs of spinach latent virus[J]. Arch Virology，1997，142(6)：1213－1226.

林　姗,陆兴利,赵金鹏,等. 四川省猕猴桃溃疡病发生的气象条件和综合防治[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):123 – 126.
doi:10.15889/j. issn. 1002 – 1302. 2020. 09. 024

四川省猕猴桃溃疡病发生的气象条件和综合防治

林　姗[1,2], 陆兴利[2], 赵金鹏[2], 刘　原[3], 罗家栋[4], 罗　伟[5], 李　庆[6], 王茹琳[1,2,6]
(1. 中国气象局成都高原气象研究所/高原与盆地暴雨旱涝灾害四川省重点实验室,四川成都 610072;
2. 四川省农村经济综合信息中心,四川成都 610072;3. 四川苍溪猕猴桃研究所,四川苍溪 628400;
4. 四川省宜宾市农业农村局,四川宜宾 644000;5. 四川省自贡市气象局,四川自贡 643000;6. 四川农业大学农学院,四川成都 611130)

摘要:猕猴桃溃疡病是一种毁灭性细菌病害,严重危害猕猴桃产业。近年来,猕猴桃溃疡病在四川省危害程度不断加剧,发生面积不断增加,对四川省猕猴桃生产造成重大损失。分析总结低温多雨是四川省猕猴桃溃疡病发生的主要气象条件,并通过对四川省成都、巴中、广元、雅安、宜宾以及绵阳等地区的猕猴桃溃疡病发病情况和发病特点的调查分析,发现品种、海拔和树龄与溃疡病的发生直接相关,表现为在被调查的 4 个品种中,红阳最感病,徐香最抗病;海拔越高,溃疡病危害越严重;溃疡病发病程度随树龄的增加逐渐加重。在此基础上对猕猴桃溃疡病提出综合防治措施建议,皆在为四川省猕猴桃产业提供服务。

关键词:猕猴桃;溃疡病;四川省;气象条件;病情调查;综合防控
中图分类号:S436.634.1⁺9　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1002 – 1302(2020)09 – 0123 – 04

猕猴桃(*Actinidia*)是一种具有丰富营养价值的新兴水果,富含氨基酸、维生素和矿物质等营养元素,因此被誉为“维 C 之冠”“水果之王”“人间仙果”等。同时,猕猴桃在医学上具有很高的科研价值,研究发现,猕猴桃根、鲜果中均可提取到有明显抗肿瘤作用的成分。猕猴桃具有丰富的营养价值和极高的经济价值,近年来我国猕猴桃产业得以快速发展,目前我国猕猴桃年种植面积、产量均居世界首位,且种植规模仍逐步扩大[1]。四川省具有最为丰富的猕猴桃种质资源,同时也是栽培面积仅次于陕西省的猕猴桃栽培大省,截至 2012 年全省栽培面积达 2.88 万 hm^2。随着栽培面积的不断扩大,在引种、购苗和采粉过程中,由于缺乏合理布局规划和严格的检疫措施,造成猕猴桃溃疡病严重发生,对产业发展造成极大威胁[2]。猕猴桃溃疡病是一种毁灭性细菌灾害,严重危害猕猴桃产业,近年来在四川省危害程度不断加重,发生面积不断增加,对四川省猕猴桃生产造成重大损失。为探究四川省猕猴桃溃疡病的危害程度及发病原因,本研究就该病害的发生情况进行调查调研并提出综合防治措施。

1　猕猴桃溃疡病危害症状和特点

1.1　危害症状

通过对四川省猕猴桃溃疡病发生状况调查发现,该病主要危害植株叶片、花和枝干。发病初期病斑皮层隆起,组织变软,病斑呈褐色并流胶。胶液从主干伤口、芽眼等裂缝中流出,胶液初期为乳白色蛋清状,后期胶液变成黄褐色,在与植株伤流

收稿日期:2019 – 04 – 19
基金项目:高原与盆地暴雨旱涝灾害四川省重点实验室科技发展基金(编号:省重实验室 2018 – 重点 – 05 – 11、省重实验室 2018 – 青年 – 31、省重实验室 2018 – 重点 – 05 – 04);国家现代农业产业体系四川水果创新团队猕猴桃病虫害综合防治岗位(编号:2013 – 2018)。
作者简介:林　姗(1986—),女,四川成都人,硕士,助理工程师,主要从事病虫害气象指标研究工作。Tel:(028)87360982;E – mail:523236247@qq.com。
通信作者:王茹琳,博士,工程师,主要从事气候变化与病虫害关系研究工作。Tel:(028)87360982;E – mail:398927566@qq.com。

[3] Fotopoulos V, Dovas C I, Katis N I. Incidence of viruses infecting spinach in Greece, highlighting the importance of weeds as reservoir hosts[J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93(2): 389 – 395.
[4] Lebas B, Ochoa – Corona F M, Tang Z J, et al. First report of Spinach latent virus in tomato in New Zealand[J]. Plant Disease, 2007, 91(2): 228.
[5] Vargas A J, Mclane H, Bush E, et al. *Spinach latent virus* infecting tomato in Virginia, United States[J]. Plant Disease, 2013, 97(12): 1662 – 1663.
[6] Mustafa G, Erbay E, Semih E, et al. Occurrence of viruses infecting spinach in Western Anatolia of Turkey [J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2014, 12(1): 272 – 275.