

侵染广东顺德 2 种兰花的辣椒褪绿病毒分子鉴定

沈阳¹, 洪旭¹, 吕文刚¹, 钟海伟¹, 杜奕华¹, 张群玲¹, 李云锋^{2*}

(1. 顺德出入境检验检疫局, 广东顺德 528303; 2. 华南农业大学农学院, 广东广州 510642)

摘要 [目的]对侵染蝴蝶兰和文心兰的辣椒褪绿病毒进行田间调查, 并进行分子鉴定, 为广东顺德花卉顺利出口提供技术支持和把关服务。[方法]根据辣椒褪绿病毒的一对特异性引物核壳体(nucleocapsid, N)基因, 应用 RT-PCR 检测方法对 2 种兰花疑似感染病毒的植株进行分子鉴定。[结果]蝴蝶兰(样品编号 2、3、5 和 10)和文心兰(样品编号 6)感染辣椒褪绿病毒, 系统进化树表明 2 种兰花感染的辣椒褪绿病毒与该病毒泰国分离物以较高的后验概率聚为同一类群。[结论]辣椒褪绿病毒已在广东顺德的蝴蝶兰和文心兰上发生危害, 且文心兰感染辣椒褪绿病毒为国内首次报道, 出口企业需加强检疫监控工作。

关键词 蝴蝶兰; 文心兰; 辣椒褪绿病毒; 鉴定

中图分类号 S41 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)04-0117-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.04.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Molecular Identification of *Capiscum chlorosis virus* Infected Two Species of Orchids in Shunde, Guangdong Province

SHEN Yang, HONG Xu, LÜ Wen-gang et al (Shunde Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shunde, Guangdong 528303)

Abstract [Objective] Field investigation and molecular identification of CaCV infected with *Phalaenopsis* and *Oncidium* were conducted, to provide technical supports and security services for the smooth export of flowers in Shunde, Guangdong. [Method] Based on the nucleocapsid (N) gene of a pair of specific primers of CaCV, the two species of orchids with suspected virus infection were identified by RT-PCR. [Result] *Phalaenopsis* (sample No. 2, 3, 5 and 10) and *Oncidium* (sample No. 6) were infected with CaCV. Phylogenetic tree showed that the two orchids infected with CaCV and the Thai isolate of the virus were clustered into the same group with higher posterior probability. [Conclusion] *Capiscum chlorosis virus* has been harmful in *Phalaenopsis* and *Oncidium* in Shunde, Guangdong Province, the infection of *Oncidium* with CaCV is the first reported in China. Export enterprises need to strengthen quarantining and monitoring work.

Key words *Phalaenopsis*; *Oncidium*; CaCV; Identification

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp)能开出形如蝴蝶飞舞般的花朵,深受花迷们的青睐,素有“洋兰王后”之称。文心兰(*Oncidium* sp)花朵奇异可爱,形似飞翔的金蝶,极富动感,是世界重要的盆花和切花种类之一,又称“吉祥兰”。然而,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,对兰花产量和品质产生了严重影响。目前,至少有 57 种病毒可感染兰科植物^[1]。2008 年,中国台湾地区首次报道辣椒褪绿病毒(*Capiscum chlorosis virus*, CaCV)侵染蝴蝶兰品种^[2],国内仅有辣椒褪绿病毒侵染蝴蝶兰的报道^[3-4],鲜见该病毒侵染文心兰的文献报道。广东顺德,素称“千年花乡”,被业内称为花卉业的“圣地”,2015 年成功创建国家级出口种苗花卉质量安全示范区,区内种植及出口花卉种类繁多,品质优良,特别是蝴蝶兰、文心兰等兰花出口量排全国前列。为了有效地应对进口国对顺德出口兰花的植物检疫措施,应尽早检出感病兰花植株并实施销毁,避免兰花出口受到影响。笔者根据辣椒褪绿病毒的一对特异性引物核壳体(nucleocapsid, N)基因,应用 RT-PCR 检测方法鉴定侵染蝴蝶兰和文心兰的辣椒褪绿病毒,以期出口花卉企业提供技术支持和保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疑似病株样品的采集。于 2018 年 4—8 月,先后 4 次在顺德多家花卉种植基地开展了蝴蝶兰、文心兰的病毒病害

调查,采用田间调查与访问有经验的花农等形式相结合。选取普查点,覆盖调查点面积的 80% 以上。采用 2 种调查方法:①简单随机取样法,利用随机数字表或非主观地抽取一个随机样本,适用于有害生物分布比较均匀的地块;②系统取样法(顺序取样法),在调查区内按一定的间隔抽取一个取样单位,包括等距离平行取样、对角线取样等。常采用五点取样法,每点不少于 20 株。采集具有疑似病毒病症状的蝴蝶兰和文心兰全株或部分组织,主要是植株叶片,详细记录病害发生部位和危害程度,系统描述病害发生的症状。拍摄照片,并将感病标本携回实验室进行进一步处理与病原鉴定。

1.1.2 材料。RNA 及 DNA 提取试剂盒、PCR 产物胶回收试剂盒、PCR 试剂和 DNA Marker 均购于美津生物技术公司;其他生化和普通化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 核酸抽提。采用 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒,依照产品说明书所示步骤抽提样品总 RNA, -20 ℃ 保存备用。利用常规的 CTAB 法对样品进行总 DNA 抽提^[5-6], -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 病毒引物的设计。根据 GenBank 数据库 CaCV 的核壳体蛋白基因的保守序列分别设计引物。上游引物 ac-1: 5'-AGAGCAATCGGGG-3', 下游引物 ac-2: 5'-GTTCTAG-CAAAAGCACCT-3', 预计扩增产物 864 bp。

1.2.3 RT-PCR 和 PCR 扩增及电泳观察。以感病组织总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 试剂盒提供的一步法进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统中观察扩增结果。

基金项目 广东出入境检验检疫局科技计划项目(2018GDK64)。

作者简介 沈阳(1976—),男,安徽灵璧人,农艺师,从事植物检疫研究。*通信作者,教授,从事植物病理学研究。

收稿日期 2018-09-30

RT-PCR 扩增程序如下:50 ℃ 反转录 30 min,94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.4 测序结果分析。对电泳目的条带切割回收,送北京奥科生物技术公司进行测序。登录 NCBI 官网,将测序结果输入 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行相似性比对。根据相似性确定病毒种类,再进一步利用 Mega5.1 软件对核苷酸序列进行多序列分析比较和构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰和文心兰病毒病危害症状 由图 1 可知,疑似感染病毒病的 2 种兰花病害症状主要表现在叶片,一般在叶片

上出现斑驳、花叶、坏死或斑点,少量植株表现为无症状,初步统计发病率约为 10%。

2.2 蝴蝶兰与文心兰病毒种类的分子检测 以反转录得到的总 DNA 为模板,将图 1 疑似感病的全部样品用 CaCV 的特异性引物核壳体基因进行 PCR 检测,从表现典型症状的蝴蝶兰(样品编号 2、3、5 和 10)和文心兰(样品编号 6)中扩增得到大小为 864 bp 左右的条带,与感染 CaCV 的阳性对照扩增结果一致(图 2)。结果表明采集的蝴蝶兰和文心兰的上述 5 个样品可能被 CaCV 侵染危害,2 种兰花其他疑似感病植株未被 CaCV 侵染。



图 1 蝴蝶兰和文心兰病毒病疑似危害症状

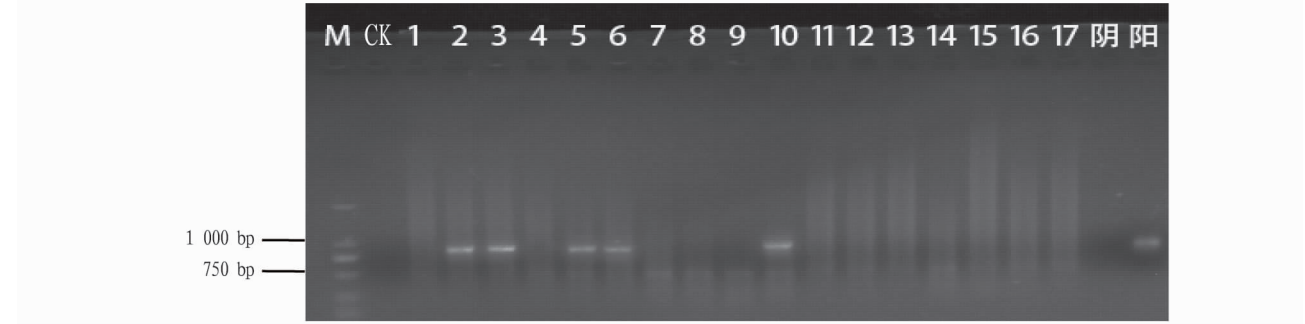
Fig.1 Suspected damage symptoms of virus disease of *Phalaenopsis* and *Oncidium* orchid

2.3 蝴蝶兰与文心兰 CaCV 顺德分离物部分序列分析 将 PCR 扩增获得的约 864 bp 的片段进行纯化,并对电泳目的

条带切割回收和测序。经 BLAST 程序 nucleotide blast 进行序列相似性检索和分析,结果表明检测为阳性的顺德 2 种兰

花 5 个样品得到的病毒基因组部分序列与 GenBank 中 CaCV 泰国分离物(登录号 FJ947156.1)同源率最高,为 98%~99%。由图 3 可知,顺德 2 种兰花的 5 个样品确认感染 CaCV,并且

与 CaCV 泰国分离物以较高的后验概率聚为同一类群。序列聚类结果表明,在广东顺德蝴蝶兰和文心兰上发现的 CaCV 可能是由泰国传过来的。



注:M.DNA Marker;1~17.兰花样品编号,其中 16、17 分别重复样品 1 和 11;阳为感染 CaCV 的阳性对照;阴为健康对照;CK 为无菌清水对照
Note:M.DNA Marker;1-17.Orchid samples No.,No.16,17 repeat samples No.1 and 11 respectively;Positive:positive control of CaCV infection;Negative: healthy control;CK:sterile water control

图 2 兰花 CaCV RT-PCR 检测电泳结果
Fig.2 Electrophoresis of orchid CaCV RT-PCR

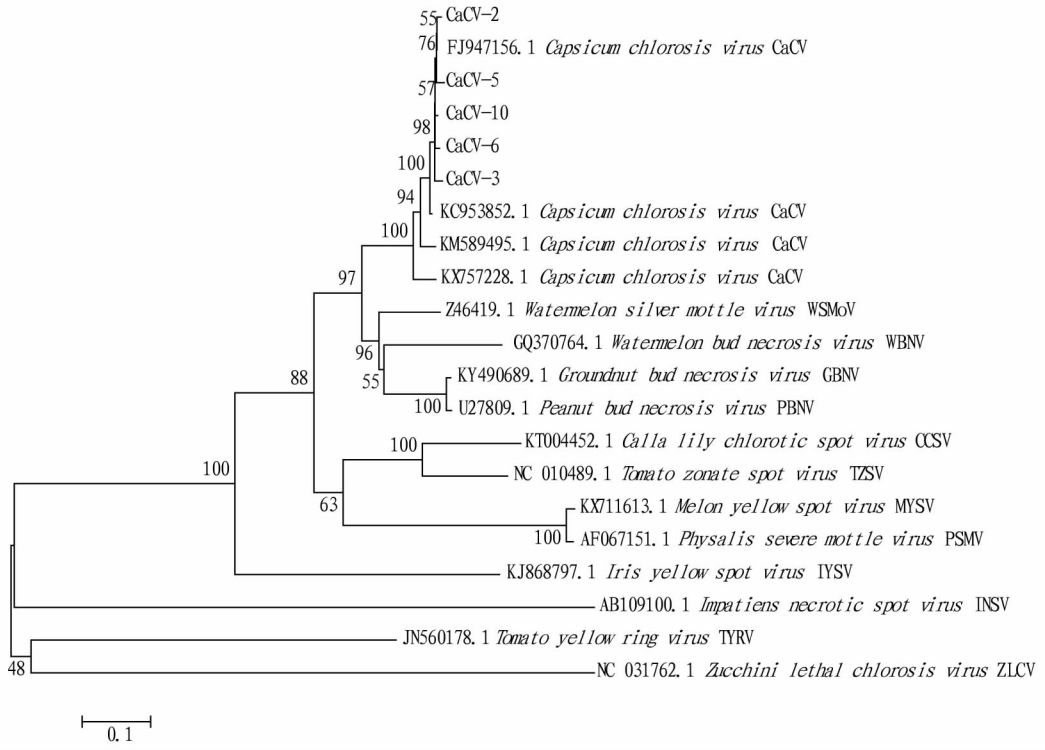


图 3 基于 CaCV 扩增序列和 Orthotospovirus 其他病毒序列构建的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree constructed from CaCV amplification sequence and other virus sequences of Orthotospovirus

3 结论与讨论

2017 年,国际病毒分类委员会(ICTV)将布尼亚病毒科(Bunyaviridae)的番茄斑萎病毒属归类到新增的番茄斑萎病毒科(Tospoviridae),属名由 Tospovirus 改为 Orthotospovirus,该属现有 11 个确定种^[7],CaCV 是西瓜银斑驳病毒(Watermelon silver mottle virus, WSMoV)的一个株系^[8],该病毒在蝴蝶兰和文心兰的传播途径为蓟马传播或无性繁殖传播^[9-10]。Orthotospovirus 病毒引起植物病害症状主要有坏死、褪绿、黄化环形病斑、银色、局部枯斑、矮化和斑驳。从症状表现看,在蝴蝶兰和文心兰上主要表现为斑驳、花叶、坏死或斑点等典型

症状。
蝴蝶兰和文心兰感染 CaCV 后,观赏价值受到影响,甚至不能顺利出口,对于以出口为导向的顺德花卉种植企业尤为重要。目前在危害兰花的各类病害中,生物防治和化学防治对病毒病仍然无大的效果,因此对兰花病毒病的预防显得极为重要。
目前主要从以下几个方面对兰花的病毒病进行综合防治:①培育无毒种苗,大量种植无毒兰花种苗并采取有效的防护措施使种苗不被病毒侵染,从而繁育、生产无毒小苗;
(下转第 139 页)

茶树在生长过程中叶片间的上下交叠和相互障蔽现象十分严重,作物的株冠层是一种特殊的小生态环境,要把药液喷洒到株冠层内并要求全部喷湿,在技术上和理论上都是不可能的^[10]。因此在施药过程中,应充分考虑目标害虫的空间分布,选择不同的喷雾机具,使药液均匀附着在茶树上,以达到最佳防治效果。综合该研究数据表明,机动喷雾组施药后最佳虫口减退率达 96.52%、最佳防效达 96.53%,且持效性更强;工效为电动喷雾组的 2.5 倍、人工喷雾组的 3.3 倍;总成本较人工组省 52.5 元/hm²。结合实践操作,使用机动喷雾器进行农药喷施,机器操作动力大,农药呈弥雾状态,雾滴细而均匀,施用同等剂量农药后,叶蝉虫口减退率更高,防效更好且持久,低成本高效率,为此次研究效果最佳喷施方式,此次试验结果与夏龙会等^[11]的研究结果基本一致。因此,建议在经济条件允许范围内建议使用机动喷雾器进行农药喷洒。

通过展开农药精量化研究,初步明确了帕力特的施用浓度对茶树的影响及对叶蝉的防效,同时,筛选了最佳喷施机械,为大面积开展新型非水溶性农药帕力特的推广应用、以及如何采用喷施方式提高叶蝉防效提供了理论数据。结合农药精量化核心示范点防治效果,于 2015 年 6 月结合小区试验研究结果在茶园对使用机动喷雾器喷施 450 mL/hm² 帕力特药剂进行了示范推广应用,示范面积高县 366.7 hm²、宜宾县 230.0 hm²、江安县 113.3 hm²,2016 年在宜宾地区 17 500.0 hm² (宜宾地区 2016 年总投产茶园共计 59 466.7 hm²) 投产茶园进行推广应用,推广应用过程当中得

到了广大茶农好评。

随着人民生活水平的提高,茶农劳务成本也在不断提高,如何以更低廉的成本达到更好的效果,是茶园管理中必须考虑的问题之一。该研究提出的使用机动喷雾器进行农药喷施,不仅能充分喷洒农药,达到更好的防效,且整体成本也低于常规的人工、电动喷雾器,值得推广应用。该研究农药精量化仅针对帕力特进行了系统性研究,在条件允许情况下还应加大试验研究范围,结合宜宾茶区实际情况对新型农药均进行相关研究,从科学角度为茶农提供最佳选择,创造茶园最佳利益。

参考文献

- [1] 吴其钜.无公害茶叶栽培技术及病虫害防治措施探析[J].农家参谋,2018(17):85.
- [2] 王春梅,叶玉龙,刘跃云,等.四川省宜宾市茶园非水溶性农药帕力特药效研究[J].安徽农业科学,2015,41(15):6692-6693,6696.
- [3] 王志,朱飞,王章学,等.非水溶性农药帕力特防治茶棍蓃马效果研究[J].农业灾害研究,2014,4(4):49-50,60.
- [4] 李赛.茶园怎样合理使用农药[J].农村实用技术,2009(3):44.
- [5] 刘丰静,李慧玲,王定锋,等.240g/L 帕力特悬浮剂防治茶橙瘿螨试验[J].福建茶叶,2014,36(6):24-25.
- [6] 王绍梅,宋文明,李崇兴.新农药凯恩、帕力特茶园田间防治试验[J].福建茶叶,2013(6):38-39.
- [7] 肖卫平,王蓉,郑松,等.6 种手动喷雾器田间使用效果比较[J].耕作与栽培,2007(3):38-39.
- [8] 杨向黎,李杰.农药的精量施药技术[J].今日农药,2009(5):44.
- [9] 雷该翔,方景英,沈葵英.凯恩与帕力特防治茶小绿叶蝉药效[J].茶叶科学技术,2012(4):18-19.
- [10] 屠豫钦.植物化学保护与农药应用工艺[M].北京:金盾出版社,2018:198-219.
- [11] 夏会龙,陈雪芬,肖强.改进茶园农药喷撒技术的理论探讨[J].中国茶叶,1989(3):10-11.

(上接第 119 页)

②加强植物检疫工作,从目前国内发现的兰花病毒基因序列分析结果可知,CyMV 和 ORSV 分离物与荷兰、韩国、日本等地的分离物同源性很高^[11],因此加强口岸检疫意义重大;③加强对兰花种植基地蚜虫、飞虱、叶蝉、螨类和线虫等有害生物综合防治工作,这几类有害生物是传播病毒病的重要媒介生物,其能够将其他植物的病毒病传染到兰花,造成兰花病毒病的蔓延扩散;④定期清园,销毁病叶、杂草、老叶等潜在病毒载体,对外人进入种植场所进行严格限制,降低将外界病毒带入兰花种植场的风险;⑤加强农业栽培措施,适当降低兰花种植密度,例如 CymMV 可以通过汁液传播,尽可能避免兰花植株叶片间的相互重叠和摩擦损伤,以减少病毒通过叶片伤口交叉感染^[12]。

笔者通过核酸提取、PCR 扩增、基因序列分析并构建系统进化树,确定了 CaCV 侵染广东顺德蝴蝶兰和文心兰这 2 种兰花品种,为花卉种植企业有效鉴别染病兰花植株提供技术支持,并为顺德兰花的顺利出口提供把关服务。

参考文献

- [1] LEE C H,ZHENG Y X,JAN E J.The orchid-infecting viruses found in the 21st century[M]//CHEN W H,CHEN H W.Orchid biotechnology III.New

- Jersey:World Scientific,2015:145-157.
- [2] ZHENG Y X,CHEN C C,YANG C J,et al.Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis orchids*[J].European journal of plant pathology,2008,120(2):199-209.
- [3] 程晓非,董家红,方琦,等.从云南蝴蝶兰上检测到番茄斑萎病毒属病毒[J].植物病理学报,2008,38(1):31-34.
- [4] 吴竹妍,刘勇,黎园,等.广州蝴蝶兰上检测到辣椒褪绿病毒[C]//郭泽建,侯明生.中国植物病理学会 2011 年学术年会论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2011.
- [5] HARRISON B D,LIU Y L,KHALID S,et al.Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan[J].Annals of applied biology,1997,130(1):61-75.
- [6] 左瑞娟.CTAB 法在提取植物病原物核酸中的应用[J].文山学院学报,2012,25(3):8-11.
- [7] 唐霜,沈妹,史君明,等.布尼亚病毒目新分类概述[J].生物多样性,2018,26(9):1004-1015.
- [8] ZHENG Y X,CHEN C C,JAN F J.Complete nucleotide sequence of *capsicum chlorosis virus* isolated from *Phalaenopsis orchid* and the prediction of the unexplored genetic information of tospoviruses[J].Archives of virology,2011,156(3):421-432.
- [9] GERMAN T L,ULLMAN D E,MOYER J W.Tospoviruses:Diagnosis molecular biology,phylogeny,and vector relationships[J].Annual reviews of phytopathology,1992,30:315-348.
- [10] 吴竹妍.西瓜银斑病毒的分子特性及抗血清的制备[D].广州:华南农业大学,2012.
- [11] 袁守鑫,谭冠林,李凡,等.云南部分兰花病毒病的病害调查及病原鉴定[J].云南农业大学学报,2008,23(3):325-328.
- [12] 刘黎卿,林志楷,郭莹.蝴蝶兰病毒病研究进展及防治对策综述[J].安徽农学通报,2010,16(24):21-23,126.