

苹果锈果类病毒实时荧光定量反转录PCR检测 及其在苹果树体内的扩散转移规律

郝娜娜 李紫腾 张静怡 孟祥龙 王亚南* 曹克强*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071001)

摘要: 为明确苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)在苹果树体内的转移规律, 本研究建立高灵敏度的实时荧光定量反转录PCR(real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)方法, 利用此方法检测该病毒在树体内的转移规律以及苹果果实上病毒积累量与症状的相关性。结果表明, 本研究所建立的RT-qPCR检测技术能针对枝皮、果实、根组织中的ASSVd进行准确、灵敏的检测, 检测灵敏度下限为41.00 fg/ μ L(相当于 5.95×10^5 copies/ μ L RNA); 在嘎拉苹果树上接种ASSVd, 2个月后植株各组织部位病毒积累量均较高, 尤其是接种枝先端和树冠下层枝组, 根部病毒积累量很少; 接种4个月后, 各组织部位病毒积累量下降, 病毒在植株上部、下部和根部均匀分布; 接种6个月后, 在接种枝中下部和根部病毒积累量相对较高; 接种8个月后, 地上部各组织部位病毒积累量很低, 主要集中在根部。在花脸果实着色不同的果皮中ASSVd积累量差异显著, 未着色果皮病毒积累量是着色果皮的4~40倍。表明ASSVd自果树枝干嫁接接种后, 病毒先在接种枝中增殖, 然后向根部转移, 病毒的增殖和转移可能主要受寄主生长发育时期的影响, 花脸病症状表现与病毒积累量密切相关。

关键词: 苹果锈果类病毒; 实时荧光定量RT-PCR; 病毒移动; 症状差异

Detection of apple scar skin viroid by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR and its movement in an apple tree

XI Nana LI Ziteng ZHANG Jingyi MENG Xianglong WANG Yanan* CAO Keqiang*

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: To clarify the movement of apple scar skin viroid (ASSVd) in apple trees, a detection method based on real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) with high sensitivity was established. The correlation between viroid accumulation and symptoms was also explored. The results showed that the detection method could be used to accurately and sensitively detect ASSVd in several parts of apple tree including branch bark, fruit and roots. The detection sensitivity for each part was above 41.00 fg/ μ L (5.95×10^5 copies/ μ L RNA). After inoculation of gala apple tree with ASSVd, viroid accumulation was relatively high in all tissues of the plant in two months post inoculation (mpi), especially in the apex of inoculated branch and the lower branches of the canopy. The viroid accumulation in the root was the lowest. In 4 mpi, the viroid accumulation of each tissue site was generally lower than that in June, and the viroid was evenly distributed in the upper, lower, and root parts of the plant. In 6 mpi,

基金项目: 国家重点研发专项(2016YFD0201100), 河北省自然科学基金项目(C2019204327), 河北省人力资源和社会保障厅引进留学人员资助项目(C201839)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wyn3215347@163.com, cao_keqiang@163.com

收稿日期: 2020-02-24

the viroid accumulation was relatively high in the lower part and root of inoculated branches. In 8 mpi, the viroid accumulation was very low in all tissues of the above-ground parts and mainly accumulated in the roots during the dormant period. The expression levels of viral genomes in fruit peels with different pigmentations were significantly different. The accumulation of ASSVd in uncolored peels was 4 to 40 times that in colored peels. The results showed that after inoculation, ASSVd first proliferated in inoculated branches, then transferred to roots. The proliferation and movement of the viroid might be related to the growth and developmental period of the host. The symptoms of the disease were highly correlated with the accumulation of viroid.

Key words: apple scar skin viroid; real-time fluorescence quantitative RT-PCR; viroid movement; difference in symptoms

近年由苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)引起的苹果花脸病已上升为苹果生产中的主要病害(郝璐等, 2015), 可引起果实的花脸、锈果和畸形, 明显降低了苹果的商品价值, 是目前苹果生产中难以解决的问题。ASSVd是感染苹果的最小病原体之一(Daròs et al., 2006), 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科 *Pospiviroidae* 马铃薯纺锤块茎类病毒属 *Pospiviroid* (Flores et al., 1998), 存在于细胞核内, 有中央保守序列且不具有核酶活性, 非对称滚式复制, 由330个左右的核苷酸组成的单链共价闭合环状的裸露RNA分子(López-Carrasco & Flores, 2017), 主要依靠宿主提供的酶和必须物质来完成其感染周期(Flores et al., 2005)。ASSVd主要侵染苹果和梨, 对海棠、桃、杏、石榴等也可侵染(Hadidi et al., 1991; 赵英和牛建新, 2008a, b), 该病毒寄主范围广, 侵染力强, 潜育期长(廖明安等, 1993; 王际轩等, 2000), 症状表现受环境影响大, 因此早期检测显得尤为重要(徐志华, 2000); 另外组培脱毒的成功与否取决于检测方法的灵敏度, 加之类病毒不表达蛋白质, 不能采用血清学方法检测, 开发准确、灵敏的分子检测技术是苹果花脸病有效预防的前提。

植物病毒需要在植株体内经过一段时间的增殖、扩散和转移才能显症(Desvignes et al., 1999), 了解病毒在寄主中的扩散、转移和显症规律, 有助于找到病毒防控的关键时期和有效措施。病毒通过植株韧皮部实现长距离运输(Palukaitis, 1987)。Samuel (1934)研究发现番茄叶片接种烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)后, 该病毒先扩散到根部, 再由根部扩散到心叶; Singh (1977)阐明了植株接种马铃薯纺锤块茎类病毒(potato spindle tuber viroid, PSTVd)后病毒增殖量有上升-高峰-下降的规律; 张祥林和赵冰梅(1994)揭示了菜豆黄花叶病毒(bean yellow mosaic virus, BYMV)侵染寄主时先在

侵染部位不断增殖, 然后向植株上部转移, 而且只有当病毒增殖到一定浓度时, 才能引起寄主发病; 朱水芳等(1992)明确了黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)叶绿体中外壳蛋白(coat protein, CP)的浓度和花叶症状严重程度呈正相关; 袁媛等(2012)发现甜瓜感染瓜类褪绿黄化病毒(cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV)后, 症状轻度的甜瓜叶片中的CP相对表达量显著高于重度和中度的叶片; Bani-Hashemian (2015)研究表明类病毒从最初侵染的细胞经胞间连丝进行胞间移动, 在韧皮部进行远距离移动, 然后再通过胞间移动侵染包括叶肉在内的远端组织。目前果树病毒相关研究报道相对较少, ASSVd在寄主体内如何转移以及症状表现与病毒积累量的相关性还有待揭示。

因此, 本研究拟构建高灵敏度的实时荧光定量反转录PCR(real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)检测体系, 以揭示ASSVd侵染苹果树体后, 由接种点在植株体内扩散转移的规律, 并分析苹果果实不同症状区域病毒积累量的差异, 以期为苹果花脸病的早期诊断以及无毒苗木的繁育提供了更精确的检测手段, 也将为病毒侵染机理的揭示、有效防控措施的制定提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 具有典型苹果花脸病症状信依红、富士、粉红女士的8年生苹果树, 携带苹果花叶病毒(apple mosaic virus, ApMV)、苹果坏死花叶病毒(apple necrotic mosaic virus, ApNMV)和苹果凹果类病毒(apple dimple fruit viroid, ADFVd)的8年生富士苹果树, 经检测不携带ASSVd的8年生嘎拉苹果树, 所有植物材料均为河北农业大学植物保护学

院植物病害流行与综合防治研究室苹果实验园中的植株。携带苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)、苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)的苹果组培苗由河北农业大学植物保护学院植物病害流行与综合防治研究室继代保存并提供。

试剂及仪器:RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;DiaSpin 柱式 DNA 胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;Trans109 化学感受态细胞、pEASY®-T1 Simple 克隆载体、TransScript® Fly First-Strand cDNA Synthesis SuperMix,北京全式金生物技术有限公司;PurePlasmid Mini Kit,北京康为世纪有限公司;FastStart Essential DNA Green Master,罗氏诊断产品有限公司;限制性内切酶,宝生物工程(大连)有限公司;T7 RNA polymerase, New England Biolabs (Beijing)公司;RNasin® Ribonuclease Inhibitor,美国 Promega 公司;其它试剂均为国产分析纯。LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪,瑞士 Roche

公司;S1000™ Thermal Cycler 型 PCR 仪、Gel Doc™ XR+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及质粒标准品的制备

参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取携带 ASSVd 的苹果组织总 RNA,按照 TransScript® Fly FirstStrand cDNA Synthesis SuperMix 说明书合成第一链 cDNA。参照杨金凤等(2015)方法利用引物 ASSVdQxin3-F 和 ASSVdQxin3-R(表 1)扩增 ASSVd 基因组序列,本试验所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR 扩增体系:cDNA 模板 0.5 μL、20 pmol/μL 正反向引物各 1.0 μL、ddH₂O 10 μL、2×Es Taq MasterMix 12.5 μL。反应程序:94℃预变性 2 min;94℃变性 45 s,64.4℃退火 45 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃再延伸 10 min。利用 DNA 凝胶回收试剂盒对 330 bp 特异性扩增产物进行胶回收,连接至 pEASY®-T1 simple 载体上,送至深圳华大基因股份有限公司进行测序,将经鉴定正确的阳性重组质粒作为后续试验的标准品。

表 1 本研究中 ASSVd 引物序列

Table 1 Sequences of ASSVd primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段大小/bp Product size	来源 Source
ASSVd-F	ACGAGGAGAAGAAGGGACTCAC	106	吴然等, 2015
ASSVd-R	AACCCACAGCGGAAGTGGT		Wu et al., 2015
ASSVdR1-F	GGTAAACACCGTGC GTTCC	109	自行设计
ASSVdR1-R	TTTCTCACCGGCC TTCGTCG		Design in this study
ASSVdR2-F	TGTGGGTTCGCCTACAAGAA	122	自行设计
ASSVdR2-R	AAAGAGCGTGAGAGAACAGG		Design in this study
ASSVdR3-F	TTCGCCCCGCCAACGCTAAA	144	自行设计
ASSVdR3-R	TAGGCGAACCCACAGCGGAAGT		Design in this study
ASSVdQxin3-F	GGTGAGAAAGGAGCTGCCAG	330	杨金凤等, 2015
ASSVdQxin3-R	TTCGTCGACGACGACAGGTGA		Yang et al., 2015
ASSVdInvitro-pF	<i>AGAGTAATACGACTCACTATA</i> Aggtaaacaccgtgcggttcc	357	自行设计
ASSVd(<i>Stu</i> I)-R	<u>AGGCCT</u> gggaacaccaattgtgtttta		Design in this study

ASSVdInvitro-pF 中斜体字母表示 T7 启动子;下划线字母表示酶切位点。The italic letters indicate the T7 promoter, and the underlined letters indicate the digestion site of restriction enzyme in the primer ASSVdInvitro-pF.

1.2.2 RT-qPCR 检测体系的引物筛选及其特异性验证

采用 Vector NTI 11.5.1 软件设计 ASSVdR1-F/R、ASSVdR2-F/R、ASSVdR3-F/R 及 ASSVd-F/R(吴然等, 2015)(表 1), 扩增田间携带 ASSVd 的信依红果树组织样本, 25 μL 扩增体系:cDNA 模板 0.5 μL、20 pmol/μL 正反向引物各 1.0 μL、ddH₂O 10 μL、2×Es Taq MasterMix 12.5 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延

伸 30 s, 35 个循环;72℃再延伸 10 min。筛选条带特异且亮度较高的引物。然后以携带 ACLSV、ASGV、ASPV 三种潜隐性病毒的苹果组培苗及携带 ApMV、ApNMV、ADFDVd 的田间样本为检测对象, 验证引物的特异性。最后分析 RT-qPCR 检测中引物的熔解曲线确定引物。

1.2.3 RT-qPCR 检测体系的优化及标准曲线的建立
检测体系的优化:本研究所建立的 20 μL RT-

qPCR体系包括模板1 μL 、上下游引物各1 μL 、Fast-Start Essential DNA Green Master 10 μL 、 ddH_2O 7 μL 。使用20、10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{mol/L}$ 六种浓度引物扩增同一阳性样本,每种引物浓度3个重复,筛选最适引物浓度。在95℃预变性300 s,三步法95℃变性15 s,退火15 s,72℃延伸10 s共40个循环的扩增程序基础上筛选退火温度。以引物的退火温度 T_m 值为基础,退火温度根据仪器自动生成不同温度,分别为56.0、56.5、57.3、58.0、58.4、59.6、60.8、62.0、63.1、64.0、64.7和65.0℃,每种温度3个重复,筛选最适退火温度。

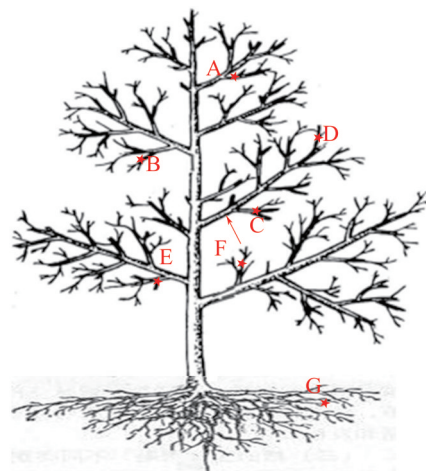
以ASSVdInvitro-pF、ASSVd(*Stu* I)-R引物引入的方法在ASSVd基因组序列中引入T7启动子和*Stu* I酶切位点,然后将线性化的阳性重组质粒作为模板,进行体外转录,测得体外转录产物的浓度,以健康组织提取的RNA溶液将体外转录产物进行10倍梯度稀释,通过公式计算病毒RNA的拷贝数,病毒RNA的拷贝数 $= (6.02 \times 10^{23} \text{ copies/mol}) \times \text{病毒RNA浓度} / (\text{RNA长度} \times 340)$,得到RNA标准品的拷贝浓度分别为 3.27×10^{11} 、 3.27×10^{10} 、 3.27×10^9 、 3.27×10^8 、 3.27×10^7 、 3.27×10^6 、 3.27×10^5 、 3.27×10^4 、 3.27×10^3 copies/ μL ,然后按照本试验建立的最适合反应体系和程序进行RT-qPCR扩增,每个浓度3次重复,以每个浓度得到的 C_q 值的平均值和已知拷贝数浓度的对数构建标准曲线。在标准曲线中, C_q 为实时荧光定量仪检测的数值,以 C_q 值为纵坐标, C 为初始模板中RNA的拷贝浓度,以其对数 $\lg C$ 为横坐标,进行线性回归分析,得到标准曲线和线性回归方程,线性回归方程为 $C_q = -\text{blg}C + a$ 。

1.2.4 RT-qPCR检测体系的特异性及灵敏度测定

对携带ASSVd、ACLSV、ASGV、ASPV、ApMV、ApNMV和ADFVd的苹果组织进行检测,根据本试验所建立的检测体系及反应程序测定验证检测体系的特异性,以健康果树组织为空白对照(CK);在果实成熟期,采集病树同一枝条上的果皮、须根、枝皮,参照多糖多酚植物总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,以健康组织RNA溶液进行梯度稀释,果皮的稀释浓度分别为 4.10×10^4 、 4.10×10^3 、 4.10×10^2 、41.00、4.10和0.41 fg/ μL ,侧根稀释浓度分别为 5.11×10^2 、 1.02×10^2 、20.44、4.10、0.82和0.16 fg/ μL ,枝皮的稀释浓度分别为 3.74×10^2 、74.80、14.94、2.99、0.59、0.118和0.02 fg/ μL ,根据本试验所建立的检测体系及反应程序测定该体系的灵敏度。

1.2.5 ASSVd在树体中转移的测定

在2019年4月初采用芽接方式对多年不显症且经RT-qPCR检测不携带ASSVd的8年生嘎拉苹果树树体中部接种ASSVd,在接种2、4、6和8个月分别在树冠上层主枝枝组(图1-A)、树冠次上层主枝枝组(图1-B)、病毒接种枝接种点近端(图1-C)、病毒接种枝接种点远端(图1-D)、树冠下层主枝枝组(图1-E)、树冠最下层主枝的枝组(图1-F)、侧根(图1-G)定点取样,每个取样点取样3份,每次重复2棵,共6棵树。利用上述建立的RT-qPCR方法定量测定ASSVd积累量,共设3次重复。根据RNA拷贝数计算公式,将其换算成ASSVd积累量,即每克植物组织中病毒RNA的拷贝数=每份植物样品所得到的RNA体积 $\times 10^{(a-C_q)/b}$ / 植物组织样品质量 $\times$ 参与定量的RNA体积。



五角星表示取样检测位点;箭头表示接种ASSVd位点。A: 树冠上层主枝的枝组; B: 树冠次上层主枝的枝组; C: 病毒接种枝接种点近端; D: 病毒接种枝接种点远端; E: 树冠下层主枝的枝组; F: 树冠最下层主枝的枝组; G: 侧根。图片引自网络资源(<https://zhidao.baidu.com/question/182808620713294604?sharesource=qzone>)。Asterisk indicates sampling sites; arrows indicate ASSVd inoculation sites. A: The branch group of the main branch above the canopy; B: the branch group of the upper main branch of the canopy; C: near site of virus-inoculated branches; D: distant site of virus-inoculated branches; E: the main branch group of the lower canopy; F: the main branch group of the lowest canopy; G: lateral root. The picture is from the network (<https://zhidao.baidu.com/question/182808620713294604?Share-source=qzone>).

图1 果树嫁接接种ASSVd的位置及检测部位示意图
Fig. 1 Schematic diagram of the locations and detection sites of healthy fruit trees grafted with ASSVd

1.2.6 显症果实不同着色果皮 ASSVd 积累量的测定

选取有典型苹果花脸病症状的信依红、富士、粉红女士的苹果果实各 5 个,在每个果实柄洼、果实中部、果实萼洼的未着色区域(凹陷部位)和着色区域(凸起部位)表皮各取 5 份样品,使用上述优化建立的 RT-qPCR 检测体系和反应程序检测未着色区域和着色区域中的 ASSVd 积累量,方法同 1.2.5。

1.3 数据分析

利用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析,采用 t 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 ASSVd RT-qPCR 检测体系的建立

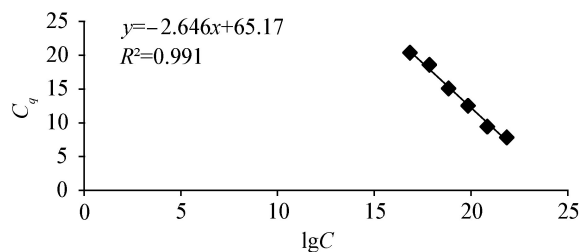
2.1.1 引物的选择及检测体系和程序的优化

选取 4 对引物进行常规 RT-PCR 扩增,其中以 ASSVdR2-F/R 扩增出的条带特异且亮度较高;以携带 ACLSV、ASGV、ASPV 三种潜隐性病毒的苹果组培苗及携带 ApMV、ApNMV、ADFVd 的田间样本为检测对象,验证该引物具有特异性;且在荧光定量检测中只出现单特异峰,最后选定 ASSVdR2-F/R 作为 RT-qPCR 检测引物。通过引物浓度的选择、退火温度的筛选,最终确定最优的 RT-qPCR 检测体系:cDNA 1 μ L、10 μ mol/L ASSVdR2-F/R 引物各 1 μ L、2 $\times$ FastStart Essential DNA Green Master 10 μ L、ddH₂O 7 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,40 个循环。

2.1.2 标准曲线的建立

对以线性化的质粒为模板体外转录得到的

RNA 进行梯度稀释,然后反转录,用引物 ASSVdR2-F/R 进行 RT-qPCR 扩增,扩增曲线中荧光增加值对应的循环数与模板初始浓度基本呈线性关系,去除线性误差较大的点,得到标准曲线方程为 $y = -2.646x + 65.170$,相关系数 $R^2 = 0.991$ (图 2),说明标准曲线重复性好。



C_q : 实时荧光定量仪检测的数值; C : 初始模板中病毒 RNA 的量。 C_q : detection value from the real time fluorescence quantitative analyzer; C : the copy concentration of the viral RNA in the initial template.

图 2 ASSVd 的 RT-qPCR 检测体系的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of RT-qPCR detection system for ASSVd

2.1.3 检测体系特异性和灵敏度测定

为验证体系的特异性,对检测携带 ACLSV、ASGV、ASPV 的苹果组培苗及携带 ASSVd、ApMV、ApNMV 和 ADFVd 的苹果枝皮进行扩增,由扩增的荧光曲线可知只有携带 ASSVd 的样品才有荧光信号(图 3),说明该体系检测 ASSVd 的特异性高;用健康组织 RNA 溶液对果皮、须根、枝皮提取的总 RNA 进行系列稀释并进行 RT-qPCR,结果显示检测灵敏度分别为 41.00、20.44、14.94 $\text{fg}/\mu\text{L}$ (图 4),根据公式计算灵敏度分别相当于 5.95×10^5 、 2.97×10^5 、 2.17×10^5 copies/ μL RNA。

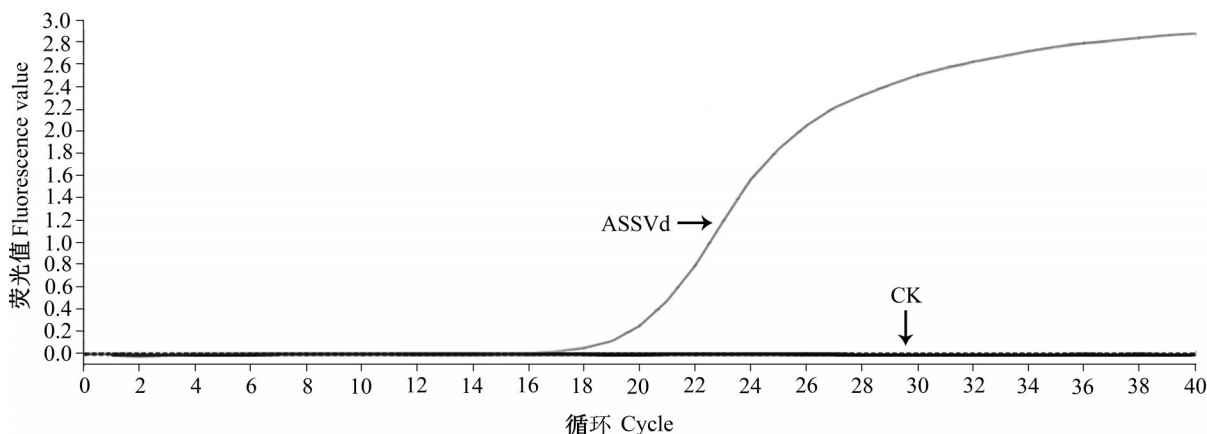


图 3 ASSVd RT-qPCR 检测体系的特异性测定

Fig. 3 Specificity of RT-qPCR detection system for ASSVd

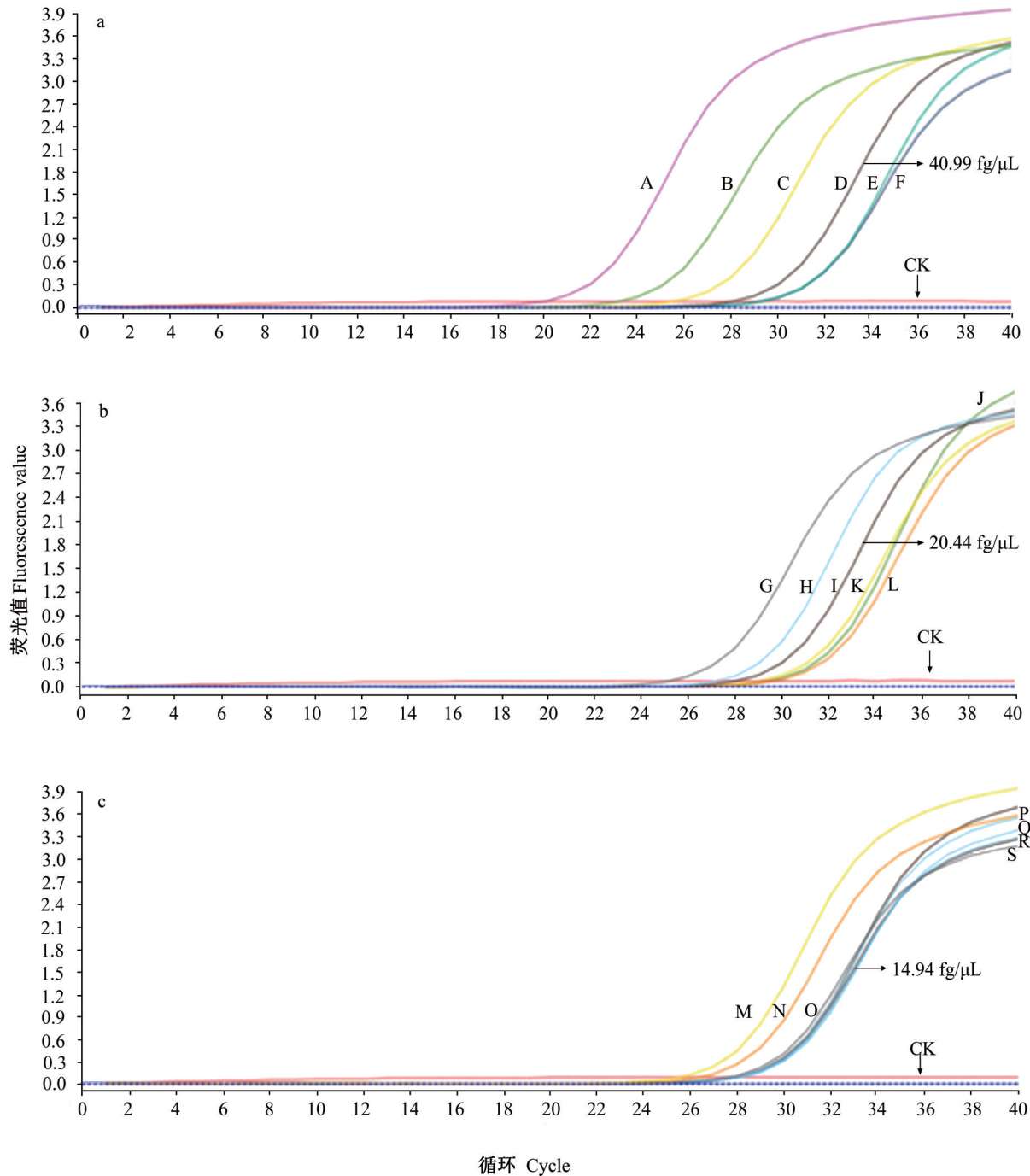
2.2 ASSVd 在树体中的移动情况

定量测定 ASSVd 的增殖和转移情况,结果显

示,接种 2 个月后,植株各组织部位病毒积累量均较高,尤其是接种枝先端和树冠下层枝组,根部病毒积

累量最少,为 2.5×10^{13} copies/g; 接种4个月后,各组织部位病毒积累量与接种2个月后相比病毒积累量有所降低,除了植株冠层最顶端和接种枝先端外,病毒在植株上部、下部和根部均匀分布;接种6个月

后,在接种枝的中下部和根部病毒积累量相对较高;接种8个月后,病毒主要集中在根部,与地上部位有显著差异(图5)。



a: 果皮; b: 侧根; c: 枝皮; A~F: 4.10×10^4 、 4.10×10^3 、 4.10×10^2 、41.00、4.10 和 0.41 fg/μL RNA; G~L: 5.11×10^2 、 1.02×10^2 、20.44、4.10、0.82 和 0.16 fg/μL RNA; M~S: 3.74×10^2 、74.80、14.94、2.99、0.59、0.118 和 0.02 fg/μL RNA。a: Peel; b: lateral root; c: branch bark; A~F: 4.10×10^4 , 4.10×10^3 , 4.10×10^2 , 41.00, 4.10 and 0.41 fg/μL RNA; G~L: 5.11×10^2 , 1.02×10^2 , 20.44, 4.10, 0.82 and 0.16 fg/μL RNA; M~S: 3.74×10^2 , 74.80, 14.94, 2.99, 0.59, 0.118 and 0.02 fg/μL RNA.

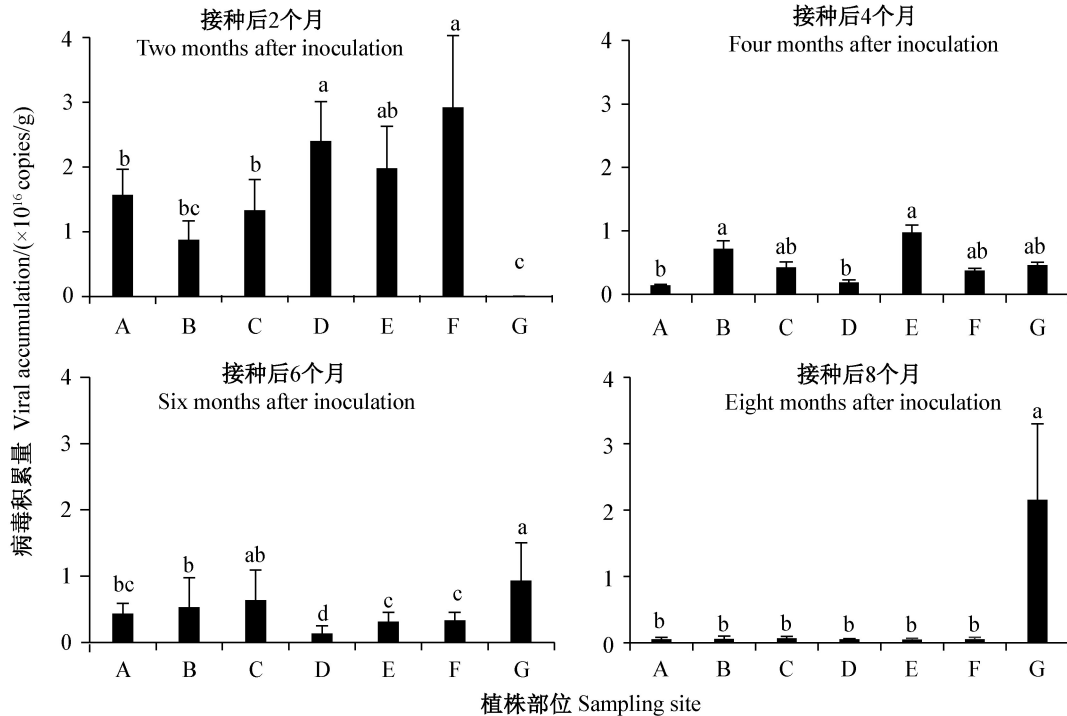
图4 三种不同苹果组织部位的ASSVd RT-qPCR检测灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of RT-qPCR detection for ASSVd using three different apple tissue parts as templates

2.3 ASSVd基因组表达量与症状的相关性

取花脸症状的果实着色果皮和未着色果皮检测病毒积累量,发现不同品种未着色果皮中的病毒

积累量与着色的果皮均有显著性差异($P=0.001<0.05$)(图6),未着色区域果皮中ASSVd积累量为着色区域果皮的4~40倍。



A: 树冠上层主枝的枝组; B: 树冠次上层主枝的枝组; C: 病毒接种枝接种点近端; D: 病毒接种枝接种点远端; E: 树冠下层主枝的枝组; F: 树冠最下层主枝的枝组; G: 侧根。A: The branch group of the main branch above the canopy; B: the branch group of the upper main branch of the canopy; C: near site of virus-inoculated branches; D: distant site of virus-inoculated branches; E: the main branch group of the lower canopy; F: the main branch group of the lowest canopy; G: lateral root.

图5 田间嘎拉苹果树接种ASSVd 2~8个月不同部位病毒积累量

Fig. 5 Viroid accumulation in different tissues of Gala apple trees in two–eight months after inoculation of ASSVd in the field

图中数据为平均数±标准差。柱上不同小写字母表示经*t*测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t* test.

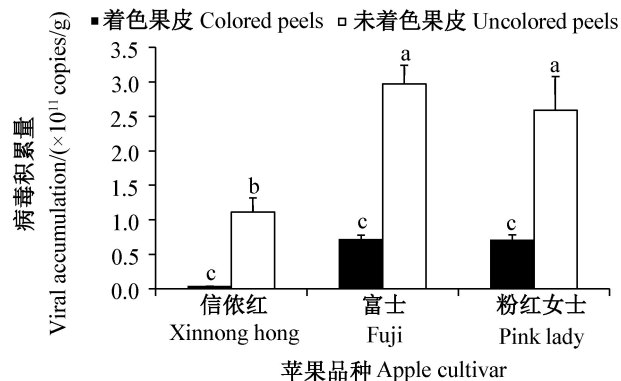


图6 果实着色部位和未着色部位果皮中ASSVd积累量

Fig. 6 ASSVd accumulation in the colored and uncolored peels of the fruit

图中数据为平均数±标准差。柱上不同小写字母表示经*t*测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t* test.

3 讨论

本研究首先筛选了适宜的RT-qPCR检测引物,然后测定了适宜的引物浓度和退火温度,以ASSVd重组质粒为标准品构建了标准曲线,建立了能够准确、灵敏检测枝皮、果皮、根3种不同组织部位的ASSVd RT-qPCR检测体系。由于植物组织中含有一定的酚酸类物质和次生代谢产物,这些物质可能会影响RNA的提取和PCR检测,各组织部位所含抑制物的成分和含量有差异,因此,对不同组织部位检测是很有必要的,经过验证,本研究建立的RT-qPCR体系适用于枝皮、根、果皮的组织类型,检测灵敏度均在41 fg/μL (5.95×10^5 copies/μL RNA)以上。多项研究报道了ASSVd RT-qPCR检测体系(吴然等, 2015; Heo et al., 2019),本研究构建的检测体系进一步丰富了ASSVd定量测定方法,而且灵敏度相对较

高,并且适用于不同组织类型。

目前,鲜有针对果树病毒在植株体内移动的研究,本研究2019年4月在嘎拉苹果树中干上采用芽接方法接种ASSVd,利用RT-qPCR检测技术对树体不同部位病毒积累量进行了检测,明确了病毒接种2个月后,在接种枝先端有大量增殖,在其它各组织部位病毒积累量也相对较高,这个时期果树正处于春末夏初,植株叶、花、果处于养分竞争期,所以在各组织部位病毒都比较活跃,尤其是在养分需求较多的组织,在根部病毒积累量最少;接种4个月后,夏末秋初,嘎拉果树已经采收,果树处于养分均衡分配时期,各组织部位病毒积累量与接种后2个月相比有所降低,病毒在植株上部、下部和根部均匀分布;接种6个月后,果树仍然处于养分均衡分配期,但养分逐渐向下集中,所以病毒在接种枝中下部和根部病毒积累量相对较高;接种8个月后,果树处于冬季养分积累期,病毒也主要集中在根部。上述现象基本明确了ASSVd在苹果植株中的移动与寄主的生长发育期密切相关,这与TMV等多种草本植物病毒的移动规律相似(Samuel, 1934; 王亚南等, 2009), Bani-Hashemian et al. (2015)对柑橘类病毒的研究也表明木本植物类病毒的长距离运动模式与草本寄主相似。在接种4个月以后病毒积累量与接种2个月后相比有所下降,这可能与气候因素有关(许仁林和易琼华, 1989)。

病毒病的防控是难以攻克的问题, ASSVd虽为非潜隐性病毒,但从侵染到显症需要一定的时间,通过检测明确病毒增殖的关键时间节点及分布的关键组织位点,结合环割、环剥、施肥等农事操作或化学防治等措施对病毒进行有效遏制,从而减轻病害的发生,此试验结果为ASSVd的防控提供了新的思路和线索。本研究结果还揭示了花脸症状果实上未着色果皮中病毒积累量显著高于正常着色的果皮,推测病毒积累可能影响了果实的着色,但具体侵染和显症机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- BANI-HASHEMIAN SM, PENSABENE-BELLAVIA G, DURAN-VILA N, SERRA P. 2015. Phloem restriction of viroids in three citrus hosts is overcome by grafting with Etrog citron: potential involvement of a translocatable factor. *Journal of General Virology*, 96(8): 2405–2410
- DARÒS JA, ELENA SF, FLORES R. 2006. Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Reports*, 7(6): 593–598
- DESIGNES JC, GRASSEAU N, BOYÉ RM, CORNAGGIA D. 1999. Biological properties of *Apple scar skin viroid*: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission. *Plant Disease*, 83(8): 768–772
- FLORES R, HERNÁNDEZ C, DE ALBA AEM, DARÒS JA, DI SERIO F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 117–139
- FLORES R, RANGLES JW, BAR-JOSEPH M, DIENER TO. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*, 143(3): 623–629
- HADIDI A, HANSEN AJ, PARISH CL, YANG X. 1991. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. *Research in Virology*, 142: 289–296
- HAO L, YE T, CHEN SY, WANG SJ, ZHOU Y, FAN ZF, GUO LY, ZHOU T. 2015. Occurrence and detection of virus diseases in some major apple-producing regions in northern China. *Plant Protection*, 41(2): 158–161 (in Chinese) [郝璐, 叶婷, 陈善义, 王少杰, 周颖, 范在丰, 国立耘, 周涛. 2015. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测. *植物保护*, 41(2): 158–161]
- HEO S, KIM HR, LEE HJ. 2019. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid. *The Plant Pathology Journal*, 35(2): 164–171
- LIAO MA, LENG HQ, REN YJ, LUO MJ, LI HX. 1993. Differences between some inclusions and fertility in apple virus-free and viral saplings. *China Fruits*, (2): 6–8 (in Chinese) [廖明安, 冷怀群, 任雅君, 罗明静, 李焕秀. 1993. 苹果无病毒与带病毒幼树某些内含物及生育的差别. *中国果树*, (2): 6–8]
- LÓPEZ-CARRASCO A, FLORES R. 2017. The predominant circular form of *Avocado sunblotch viroid* accumulates in planta as a free RNA adopting a rod-shaped secondary structure unprotected by tightly bound host proteins. *Journal of General Virology*, 98: 1913–1922
- PALUKAITIS P. 1987. *Potato spindle tuber viroid*: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology*, 158 (1): 239–241
- SAMUEL G. 1934. The movement of *Tobacco mosaic virus* within the plant. *Annals of Applied Biology*, 21(1): 90–111
- SINGH RP. 1977. Piperonyl butoxide as a protectant against *Potato spindle tuber viroid* infection. *Phytopathology*, 67(1): 933–935
- WANG JX, LIU Z, XIE XH, WU B, TONG ZG. 2000. The reaction of virus-free apple tree growth and fruit production. *Acta Horticulturae Sinica*, 27(3): 157–160 (in Chinese) [王际轩, 刘志, 谢秀华, 吴斌, 佟兆国. 2000. 苹果无病毒树的生长和结果表现. *园艺学报*, 27(3): 157–160]
- WANG YN, ZHOU K, WANG XF, ZHOU GH. 2009. Studies on the movement of *Barley yellow dwarf virus-GAV* in oat plant by RT-

- PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(3): 249–253 (in Chinese) [王亚南, 周锐, 王锡锋, 周广和. 2009. 大麦黄矮病毒-GAV在燕麦植株体内运动规律的初步研究. *植物病理学报*, 39(3): 249–253]
- WU R, LI JY, SHAO JZ, SUN JS, ZHANG H. 2015. Establishment of detection method for *Apple scar skin viroid* (ASSVd) by real-time PCR. *Journal of Fruit Science*, 32(1): 150–155 (in Chinese) [吴然, 李君英, 邵建柱, 孙建设, 张鹤. 2015. 苹果锈果类病毒实时荧光PCR检测方法的建立. *果树学报*, 32(1): 150–155]
- XU RL, YI QH. 1989. Effects of temperature on ToMV multiplication and changes of soluble leaf proteins in tomato. *Virologica Sinica*, (4): 415–426 (in Chinese) [许仁林, 易琼华. 1989. 温度对番茄花叶病毒(ToMV)增殖及番茄叶片可溶性蛋白变化的影响. *病毒学杂志*, (4): 415–426]
- XU ZH. 2000. Ecological illustration of wood disease in fruit trees. Beijing: China Forestry Publishing, pp. 23–24 (in Chinese) [徐志华. 2000. 果树林木病害生态图鉴. 北京: 中国林业出版社, pp. 23–24]
- YANG JF, LÜ YX, TANG XM, WANG YN, CAO KQ. 2015. Establishment of RT-PCR detection system for *Apple scar skin viroid*. *China Fruits*, (5): 62–67 (in Chinese) [杨金凤, 吕运霞, 唐兴敏, 王亚南, 曹克强. 2015. 苹果锈果类病毒RT-PCR检测体系的建立. *中国果树*, (5): 62–67]
- YUAN Y, ZHAO T, LIANG XZ, SHI Y. 2012. Study on the correlation between CCYV accumulation and symptom development in melon leaves. *Journal of Henan Agricultural University*, 46(6): 655–657, 709 (in Chinese) [袁媛, 赵特, 梁相志, 施艳. 2012. 甜瓜病叶CCYV积累量与叶片症状表现的相关性研究. *河南农业大学学报*, 46(6): 655–657, 709]
- ZHANG XL, ZHAO BM. 1994. A study on propagation and diversion of plant virus in broad-bean. *Journal of Shihezi University*, 12(1/2): 49–52 (in Chinese) [张祥林, 赵冰梅. 1994. 植物病毒在蚕豆植株内增殖和转移的研究. *石河子农学院学报*, 12(1/2): 49–52]
- ZHAO Y, NIU JX. 2008a. Detection of *Apple scar skin viroid* in pear by in situ RT-PCR. *Molecular Plant Breeding*, 6(4): 812–818 (in Chinese) [赵英, 牛建新. 2008a. 梨树组织中的苹果锈果类病毒原位RT-PCR检测. *分子植物育种*, 6(4): 812–818]
- ZHAO Y, NIU JX. 2008b. Detection and sequencing of *Apple scar skin viroid* from peach in Xinjiang. *Journal of Fruit Science*, 25(2): 274–276 (in Chinese) [赵英, 牛建新. 2008b. 新疆桃树上苹果锈果类病毒(ASSVd)的检测与全序列分析. *果树学报*, 25(2): 274–276]
- ZHU SF, YE Y, ZHAO F, TIAN B, RANDLE J, FRANCKI RIB. 1992. The presence of *Cucumber mosaic virus* coat protein in chloroplasts is related to the expression of mosaic symptom on tobacco. *Acta Phytopathologica Sinica*, 22(3): 39–43 (in Chinese) [朱水芳, 叶寅, 赵丰, 田波, RANDLE J, FRANCKI RIB. 1992. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白质进入叶绿体与症状发生的关系. *植物病理学报*, 22(3): 39–43]

(责任编辑部:王 璇)