

贵州百香果主要种植区病毒种类的检测

闫艺心, 乔 光, 周 奎, 张曼莹, 李蕊蕊, 文晓鹏*

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025

摘 要: 百香果 (*Passiflora edulis*) 作为贵州特色优势水果, 在巩固脱贫攻坚成果和深入实施乡村振兴战略中具有重要意义。但近年来百香果病毒病危害日趋严重, 造成产量和品质急剧下降, 严重影响产业发展。为确定贵州百香果主要种植区病毒种类、分布及复合侵染情况, 本研究从贵州省罗甸县、从江县、榕江县、镇宁县和贞丰县 5 个百香果主要种植区采集疑似感病叶片 153 份, 采用 RT-PCR 技术对其进行检测。结果表明: 样本共检测到 7 种病毒, 分别是东亚番莲病毒 (East Asian Passiflora virus, EAPV)、夜来香花叶病毒 (Telosma mosaic virus, TeMV)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)、芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV)、西番莲斑驳病毒 (Passiflora mottle virus, PaMV)、西番莲潜隐病毒 (Passiflora latene carlavirus, PLV) 和马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY)。EAPV 检出率最高, 达 96.08%, 以下依次为 TeMV (81.70%)、CMV (78.43%)、TuMV (44.44%)、PaMV (26.80%)、PVY (24.84%) 和 PLV (15.03%); 值得重视的是, PVY 主要为害马铃薯, 而侵染百香果为首次报道。本次检测到的 7 种病毒的测序结果与相应参考序列的核酸一致性均在 95% 以上, 经构建进化树发现, EAPV、TeMV、PaMV、PLV、TuMV 分别与中国各省份的百香果病毒分离物存在一定的地理聚集性, 而 CMV 和 PVY 分别与西班牙 CMV 甜瓜分离物和卢旺达 PVY 辣椒分离物亲缘关系最近, 这说明这些病毒来源及感染途径复杂, 未在国内大面积传播。本次共检测到 24 种复合侵染类型, 以 3~5 种复合侵染类型为主, 复合侵染率达 94.77%, 其中 EAPV+TeMV+CMV 组合是复合侵染中出现最多的类型; EAPV、TeMV 和 CMV 的检出率高达 78.43%~96.08%, 在 5 个百香果主要种植区均有检出, 且在多种复合侵染类型中普遍存在, 因此这 3 种病毒为侵染贵州百香果主要种植区的优势病毒。此外, 本研究建立了 EAPV、TeMV 和 CMV 的多重 PCR 检测体系, 为相关病毒的快速检测提供技术支持。

关键词: 贵州; 百香果; 病毒检测; RT-PCR; 复合侵染

中图分类号: S436.67 文献标志码: A

Detection of Virus Species from Main Plantation Areas of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) in Guizhou

YAN Yixin, QIAO Guang, ZHOU Kui, ZHANG Manying, LI Ruirui, WEN Xiaopeng*

College of Life Sciences, Guizhou University / Institute of Agro-bioengineering / Key laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Passion fruit (*Passiflora edulis*) is a characteristic and advantageous fruit in Guizhou, which is of great significance in poverty relief consolidation and the rural revitalization. However, in recent years, the viral diseases of passion fruit have become increasingly severe, leading to a sharp decline in yield and quality, which thereby seriously constrain industry development of passion fruit. In order to determine the virus species, distribution and compound infestation in the main plantation areas of passion fruit in Guizhou province, a total of 153 samples suspectedly infected by virus were collected from five main plantation orchards of passion fruit in five counties, i.e. Luodian, Congjiang, Rongjiang, Zhenning and Zhenfeng, and the virus detection was carried out by RT-PCR. The results showed that seven viruses were detected from the tested samples, namely East Asian Passiflora virus (EAPV), Telosma mosaic virus (TeMV),

收稿日期 2023-05-19; 修回日期 2023-08-01

基金项目 中央引导地方科技发展资金项目 (黔科合中引地[2023]-9); 贵州省农业农村厅种业工程项目 (黔农计财[2022]-9)。

作者简介 闫艺心 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物技术与工程。*通信作者 (Corresponding author): 文晓鹏 (WEN Xiaopeng), E-mail: xpwensc@hotmail.com。

Cucumber mosaic virus (CMV), Turnip mosaic virus (TuMV), Passiflora mottle virus (PaMV), Passiflora latene carlavirus (PLV), and Potato virus Y (PVY), among which PVY infection was firstly reported from passion fruit. EAPV was the most prevalent one with infection rate as high as 96.08%, followed consecutively by TeMV (81.70%), CMV (78.43%), TuMV (44.44%), PaMV (26.80%), PVY (24.84%) and PLV (15.03%). In the present case, the distribution of passion fruit viruses in Guizhou province and the diversity of virus sequences were analyzed. Seven viruses were detected in Zhenning, six in Zhenfeng, five in Rongjiang and Congjiang, and three in Luodian. There's a close identity between the nucleic acid of the seven detected viruses and the corresponding reference sequences (above 95%). Phylogenetic analysis revealed that EAPV, TeMV, PaMV, PLV and TuMV somewhat geographical clustered with passion fruit virus isolated from other provinces in China. CMV and PVY were most closely related to *Cucumis melo* CMV isolated from Spain and *Capsicum annuum* PVY isolated from Rwanda respectively, suggesting that the virus sequences diversely varies among the origins in China. A total of 24 types of mixed infection were detected in the main growing areas of passion fruit in Guizhou, and the complex infection rate was as high as 94.77%. The complex infection with 3–5 types predominated in the tested samples, and the combination of EAPV+TeMV+CMV was most frequent among the complex infections among which, EAPV, TeMV and CMV detected ranged from 78.43% to 96.08% in the five counties, somehow reflecting that they were the major viruses to prevent in passion fruit industry of Guizhou province. In addition, a multiplex PCR assay system for EAPV, TeMV and CMV was established in this study, which provides technical support for the rapid detection of related viruses.

Keywords: Guizhou; *Passiflora edulis*; virus detection; RT-PCR; complex infestation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.020

百香果又称西番莲（*Passiflora edulis*），是西番莲科（*Passifloraceae*）西番莲属（*Passiflora* Linn.）多年生常绿藤本热带水果，原产于南美洲，我国引种栽培后主要分布在台湾、广西、贵州、福建、广东、海南和云南等亚热带及热带地区^[1]。百香果作为“第三代新兴果树”^[2]，集果用、药用、油用和庭院观赏为一体^[3]，且当年种植当年挂果，经济见效快，我国不少地区将其列为“短、平、快”的农业项目^[4]。

在百香果种植过程中，病毒病是其效益发挥的重要制约因素^[5]。百香果感染病毒后，植株出现叶片黄化、花叶、畸变、卷曲，果实小且畸形，严重影响经济效益^[1]。由于百香果多采用营养繁殖，且长期连作，使病毒病蔓延迅速^[6]。目前，已报道能侵染百香果的病毒高达 40 余种，包括东亚西番莲病毒（East Asian *Passiflora* virus, EAPV）^[7]、夜来香花叶病毒（*Telosma mosaic virus*, TeMV）^[8]、黄瓜花叶病毒（Cucumber mosaic virus, CMV）^[9]、西番莲木质化病毒（Passion fruit woodiness virus, PWV）^[10]和豇豆蚜传花叶病毒（Cowpea aphid-borne mosaic virus, CABMV）^[11]等。在贵州种植的百香果上，严佳文等^[12]检测到 CMV 和 TeMV，任羽羽等^[13]检测到 PLV，这些结果为当地百香果产业发展及病毒病防控提供了参考，但这些检测仅涉及个别种植园，尚缺乏全省主要种植区病毒病种类和分布的报道。本研究拟采用 RT-PCR 法，

对贵州百香果的病毒种类及复合侵染情况进行鉴定分析，旨在为全省范围内百香果果园规划、种苗繁育和病毒病防控等产业问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2021—2022 年，从贵州省罗甸县、从江县、榕江县、镇宁县和贞丰县百香果种植基地，采集百香果疑似感病叶片 153 份（表 1），样品症状主要包括花叶、黄化、皱缩、卷曲等；另采集健康百香果种子萌发的实生苗叶片作为阴性对照。所有样品经液氮速冻后于-80℃超低温冰箱保存备用。

表 1 贵州百香果主要种植区田间样品
Tab. 1 Field samples of *P. edulis* collected from main plantation areas in Guizhou province

品种 Breed	采样数 Number of samples				
	罗甸县 Luodian county	从江县 Congjiang county	榕江县 Rongjiang county	镇宁县 Zhenning county	贞丰县 Zhenfeng county
台农一号	24	27	9	12	12
钦密九号		9	12	9	
黄金果	12				12
黔香一号				15	

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用 RNA 提取试剂盒（Omega Bio-Tek）提取疑似病毒侵染叶片混合样品

总 RNA，具体方法参照试剂说明书。用酶标仪测定其浓度和纯度，琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.2.2 引物合成 根据 GenBank 上已登录的序列，利用 Oligo 7 软件设计 EAPV、TeMV、CMV、TuMV、CABMV、PWV 的特异性检测引物，PaMV、PLV、PVY 的检测引物参考相关文献报道（表 2），本研究所有引物均委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行合成。

1.2.3 cDNA 合成及 RT-PCR 扩增 以疑似病毒侵染的百香果叶片 RNA 为模板，逆转录合成 cDNA 第一链，具体过程见逆转录试剂盒说明书

（TaKaRa 宝生物工程有限公司）。以 cDNA 为模板，进行 RT-PCR 扩增，扩增体系为 50 μL：2×Canace Gold PCR buffer 25 μL，Hieff Canace Gold High-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 2.5 μL，cDNA 模板 5 μL，无菌 ddH₂O 补足后混合均匀。PCR 具体反应程序为：98 ℃预变性 6 min；98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 20 s，72 ℃延伸 30 s，循环 35 次；72 ℃延伸 5 min，4 ℃保存。取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像系统观察结果。PCR 阴性对照为百香果无病毒侵染的实生苗。

表 2 百香果病毒检测所用引物及反应条件
Tab. 2 Primers and reaction conditions used for *P. edulis* virus detection

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃	PCR 产物大小 PCR product size/bp	参考文献 Reference
EAPV-F	ATGTGGGTAACACGCTTTC	53	286	本研究
EAPV-R	TGTGGCACCATCCTATCA			
TeMV-F	TGATAGTTCATTGACCCCTT			
TeMV-R	CGCTGAAGTCATAATTTAACCC	54	395	本研究
CMV-F	TTACATTAGAGACCGTAGAGC			
CMV-R	TTGTCATTGCACCTACGTT			
TuMV-F	ACGAGAGTATTTCCAACCGAT	55	690	本研究
TuMV-R	TCTTCTTTCATCTCGGGTGT			
PaMV-F	CATGTCACACAGAGCTATTGAG			
PaMV-R	GCTTCGCATTTTCAACCATAGG	50	840	[14]
PLV-F	AGTGTAGAGTTTGAGGGTGGTG			
PLV-R	TGCGGTAGGTCTCCTGATT			
PVY-F	GGCATACGGACATAGGAGAAACT	55	261	[13]
PVY-R	CTCTTTGTGTTGTCTCTTGTGT			
CABMV-F	TTCATACAATGTTGCACGAGA			
CABMV-R	GAACTGCTCTACCTTATTCG	57	447	[15]
PWV-F	AAGTACAAGAGTTGACATCCGTA			
PWV-R	AATTGACAGACCAACGTCGAG			

1.2.4 PCR 产物回收及测序 采用 DNA 凝胶回收试剂盒（TaKaRa 宝生物工程有限公司）将特异性目的片段回收纯化，连接 PEASY-Blunt 载体（全式金生物技术股份有限公司产），转化至大肠杆菌感受态中，将 PCR 阳性克隆产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。测序结果与 NCBI 数据库中对应序列进行 Blast 比对。采用 MEGA-7 的邻接法（Neighbor-Joining, NJ）进行 1000 次置信度自展分析，并构建进化树。

1.2.5 统计及分析 采用 RT-PCR 法，对采集的 153 份百香果疑似感病叶片进行病毒检测，统计

病毒检出样本数、采集样本数、分布情况及贵州百香果病毒的复合侵染类型。病毒检出率=病毒检出样本数/采集样本数×100%。

1.2.6 多重 RT-PCR 扩增体系的优化和建立 以复合感染 EAPV、TeMV 和 CMV 病毒的百香果样品 cDNA 为模板，适量稀释后进行多重 RT-PCR 扩增。对多重 RT-PCR 体系的退火温度（50、52、54、56、58、60 ℃）、引物含量（0.5、1、1.5、2 μL）和循环次数（20、25、30、35、40 次）进行梯度设置，以优化该反应体系。PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像系统观察结果。

利用优化建立后的多重 RT-PCR 扩增体系对采集的部分复合侵染样品进行检测, 以验证该体系的准确性。

2 结果与分析

2.1 感病百香果表现症状

田间调查发现, 在贵州省罗甸县、从江县、榕江县、镇宁县和贞丰县 5 个百香果主要种植区, 均有病毒病发生, 主要表现为叶片卷曲(图 1A)、皱缩、畸形(图 1B)、花叶、黄化、黄斑(图 1C)、果皮斑驳(图 1D)等症状。长期连作地区如贞丰、镇宁等, 病毒病发生率明显高于新种植地区, 新果园也有发生, 说明苗木带毒。



A: 卷曲; B: 皱缩、畸形; C: 花叶、黄化、黄斑;
D: 果皮斑驳。

A: Curling; B: Crinkled, deformed; C: Flowering leaves, yellowing, yellow spots; D: Fruit, skin mottling.

图 1 百香果病毒为害植株的田间症状表现

Fig. 1 Symptoms of *P. edulis* plant infected by virus diseases

2.2 样品病毒的 RT-PCR 检测

采用 RT-PCR 法对采集的 153 份样品进行 9 种病毒检测, 结果显示, EAPV、TeMV、CMV、TuMV、PaMV、PLV 和 PVY 共 7 对引物对可分别在 286、395、690、306、261、840、447 bp 处扩增出特异性条带, 条带位置与预期大小吻合, 清晰明亮(图 2)。CABMV 与 PWV 未扩增到预期大小的目的条带, 表明样品中未检测出这 2 种病毒; 百香果实生苗未扩增出条带, 说明百香果实生苗不带病毒, 可以作为阴性对照。

2.3 病毒序列分析

将上述检测到的 7 种病毒随机选取部分样品进行克隆测序, 将获得的序列分别命名为 EAPV-

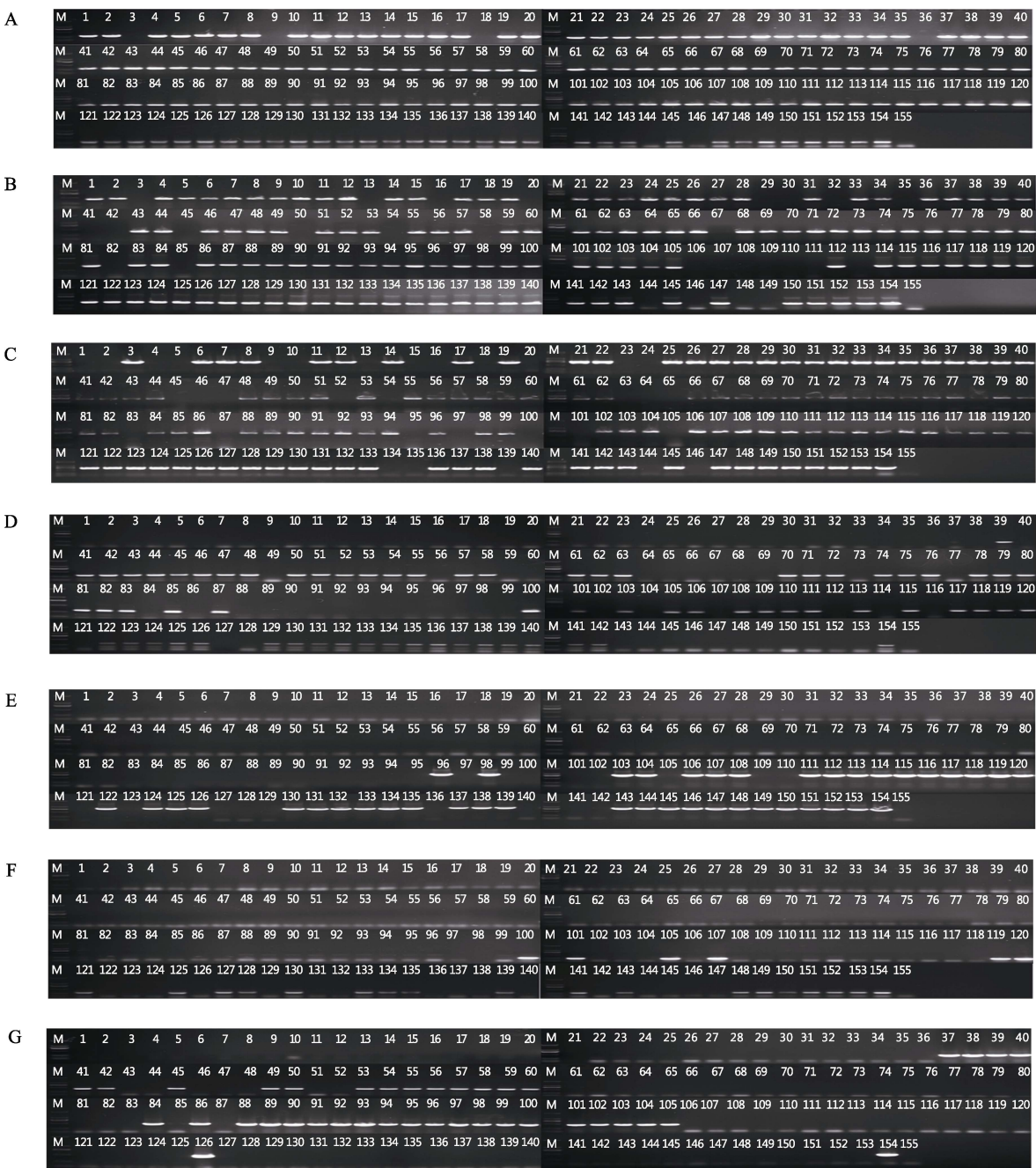
GZ、TeMV-GZ、CMV-GZ、TuMV-GZ、PaMV-GZ、PLV-GZ 和 PVY-GZ, 结果显示, 这些序列与 EAPV (KP114136)、TeMV (KJ789129)、CMV (KX525733)、TuMV (KF246570)、PaMV (MK492286)、PLV (MK340756) 和 PVY (ON604844) 核苷酸序列一致性非常高, 分别为 97.56%、98.41%、95.67%、98.37%、99.69%、99.23% 和 97.54%。

采用邻接法对 7 种病毒测序结果构建系统发育树, 结果表明, EAPV-GZ、TeMV-GZ、PaMV-GZ、PLV-GZ 和 TuMV-GZ 均与中国不同省份的百香果病毒分离物在同一个亚组, 存在一定的地理聚集性。EAPV-GZ 与台湾百香果 EAPV 分离物 (KP114136) 有较近的亲缘关系(图 3A); TeMV-GZ 与广西百香果 TeMV 分离物 (KJ789129) 聚为一支(图 3B); TuMV-GZ 除了与福建百香果 TuMV 分离物 (MK340758) 亲缘关系较近外, 还与福建厦门蝴蝶兰 TuMV 分离物 (KF246570)、中国 TuMV 芥菜分离物 (LC537522) 同处于一个亚组(图 3D); PaMV-GZ 分离物与海南百香果 PaMV 分离物 (MK492286) 以较高的自展值 (Bootstrap value=100) 聚为同一分支(图 3E); PLV-GZ 分离物和福建百香果 PLV 分离物 (MK340756) 有较近的亲缘关系, 而与福建厦门百香果 PLV 分离物 (MK340757) 亲缘关系较远(图 3F)。

CMV-GZ 和 PVY-GZ 则与不同物种的病毒分离物亲缘关系较近。CMV-GZ 和西班牙甜瓜 CMV 分离物 (KX525733)、西班牙番茄 CMV 分离物 (AM183115)、意大利西葫芦 CMV 分离物 (OM867855) 聚为一支, 有较近的亲缘关系, 而与浙江半夏 CMV 分离物 (EU723570)、中国山东矮牵牛 CMV 分离物 (EU414799) 亲缘关系较远(图 3C); PVY-GZ 和卢旺达辣椒 PVY 分离物 (ON604844) 亲缘关系较近, 而与贵州烟草 PVY 分离物亲缘关系较远(图 3G)。

2.4 主要病毒的检出率及分布

在贵州省 5 个百香果主产区采集的 153 份样品中, 全部检测出病毒。不同的病毒分布存在一定差异(表 3), EAPV 的总检出率最高, 达 96.08%, 其余依次为 TeMV (81.70%)、CMV (78.43%)、TuMV (44.44%)、PaMV (26.80%)、PVY (24.84%) 和 PLV (15.03%)。EAPV、TeMV 和 CMV 分布最为广泛, 在所有百香果种植基地均有检出, EAPV 的检出率在 88.89%~100% 之间, TeMV 的检出率在 77.78%~90.48% 之间, CMV 的检出率在

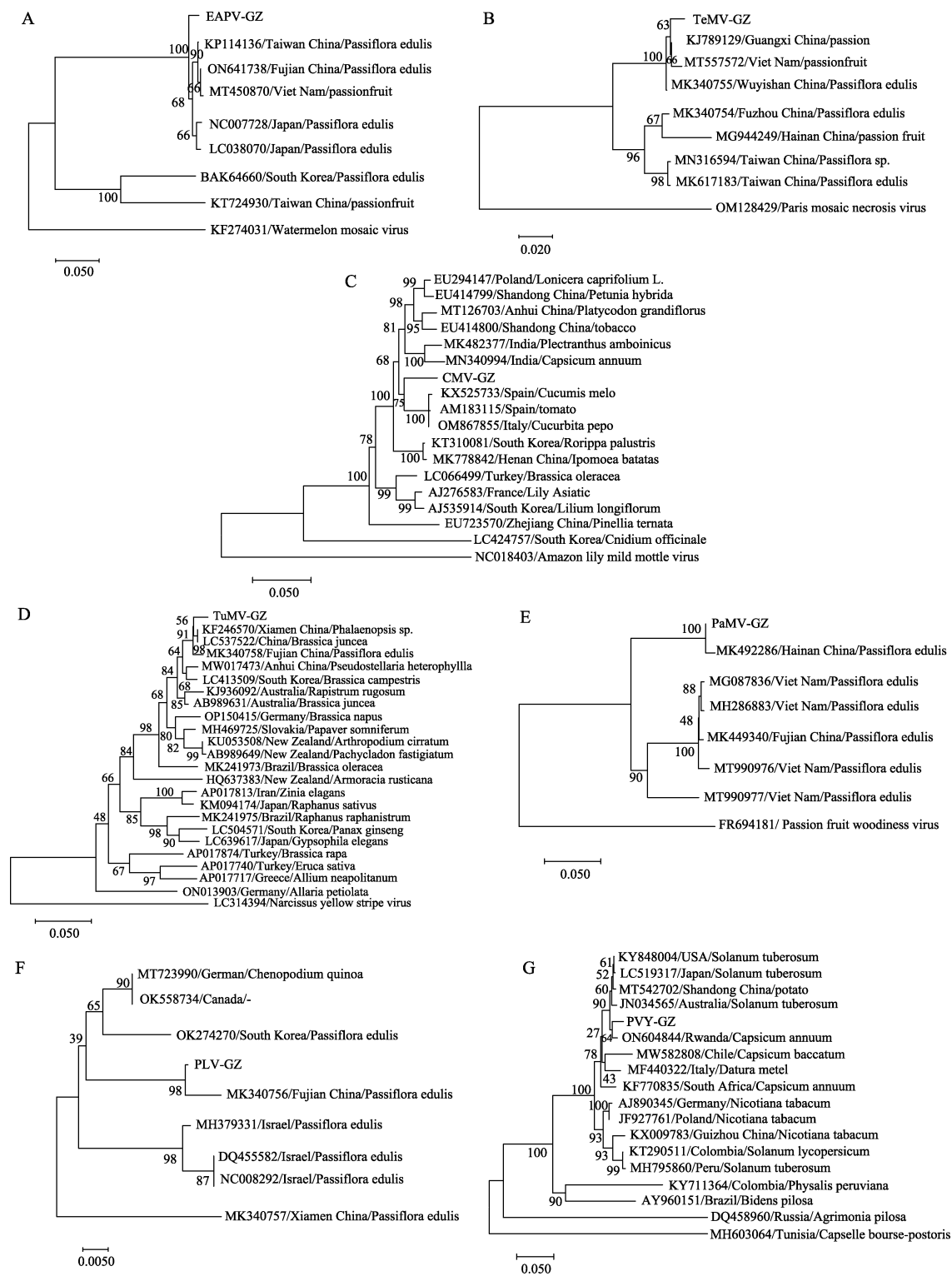


A: EAPV; B: TeMV; C: CMV; D: TuMV; E: PaMV; F: PLV; G: PVY; M: DL2000 DNA marker; 1~36: 罗甸县样品; 37~72: 从江县样品; 73~93: 榕江县样品; 94~129: 镇宁县样品; 130~153: 贞丰县样品; 154: 阳性对照; 155: 阴性对照。
A: EAPV; B: TeMV; C: CMV; D: TuMV; E: PaMV; F: PLV; G: PVY; M: DL2000 DNA marker; 1~36: Samples from Luodian county; 37~72: Samples from Congjiang county; 73~93: Samples from Rongjiang county; 94~129: Samples from Zhenning county; 130~153: Samples from Zhenfeng county; 154: CK⁺; 155: CK⁻.

图 2 百香果样品病毒的 RT-PCR 扩增结果
Fig. 2 RT-PCR amplification results of *P. edulis* sample

63.89%~90.48%之间，是贵州省侵染百香果的主要病毒。TuMV 在罗甸县未检出，在其余四县的检出率达 52.38%~63.89%；PaMV 和 PLV 的分布仅涉及镇宁县和贞丰县；PVY 在从江县的检出率最高。镇宁县检测到 7 种病毒，贞丰县检测到 6 种病毒，榕江县和从江县检测到 5 种病毒，罗甸

县检测到 3 种病毒。
2.5 病毒的复合侵染类型
本研究采集的 153 份样品中，共有 8 份为单一病毒侵染，分别为罗甸县 EAPV 样品 3 份、TeMV 样品 2 份、CMV 样品 1 份和贞丰县 PaMV 样品 2 份，其余 145 份样品均为病毒复合侵染，



A: EAPV; B: TeMV; C: CMV; D: TuMV; E: PaMV; F: PLV; G: PVY.
图 3 基于贵州百香果病毒分离物与 GenBank 相关序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed from virus sequences of Guizhou *P. edulis* with GenBank-related virus sequences

复合侵染率为 94.77%。共有 24 种复合侵染类型，其中 3~5 种复合侵染类型占比较大，仅在 7 份样品中检测到 6 种病毒复合侵染类型，均出现在镇宁县和贞丰县，未发现 7 种病毒复合侵染类型。

EAPV+TeMV+CMV 的复合侵染组合检出 23 份，是复合侵染出现最多的类型（图 4）。

2.6 多重 RT-PCR 扩增体系的建立和优化

对侵染贵州百香果的主要病毒 EAPV、TeMV

表 3 贵州百香果样品的病毒病检测结果
Tab. 3 Results of virus disease detection in *P. edulis* samples from Guizhou

项目 Istem	样品 总数 Num- ber of samples	EAPV		TeMV		CMV		TuMV		PaMV		PVY		PLV	
		检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%	检出数 Detection number	检出率 Detection rate/%
罗甸县	36	32	88.89	28	77.78	23	63.89	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
从江县	36	36	100.00	29	80.56	28	77.78	23	63.89	0	0.00	17	47.22	0	0.00
榕江县	21	21	100.00	19	90.48	19	90.48	11	52.38	0	0.00	8	38.10	0	0.00
镇宁县	36	36	100.00	29	80.56	31	86.11	21	58.33	21	58.33	13	36.11	10	27.78
贞丰县	24	22	91.67	20	83.33	19	79.17	13	54.17	20	83.33	0	0.00	13	54.17
总数	153	147		125		120		68		41		38		23	
总检出率/%			96.08		81.70		78.43		44.44		26.80		24.84		15.03

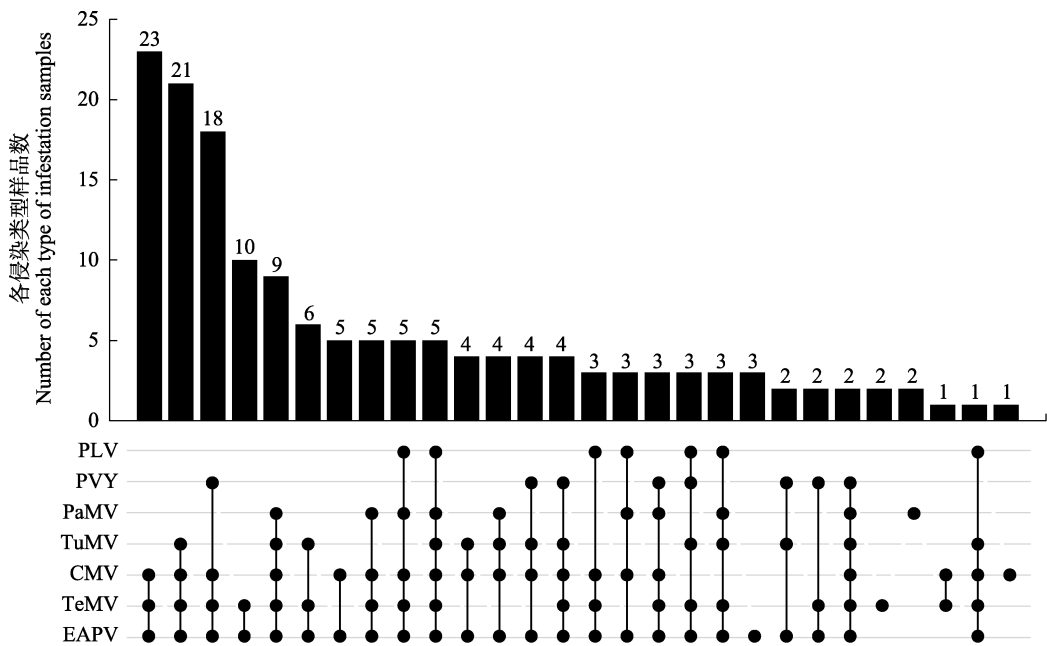
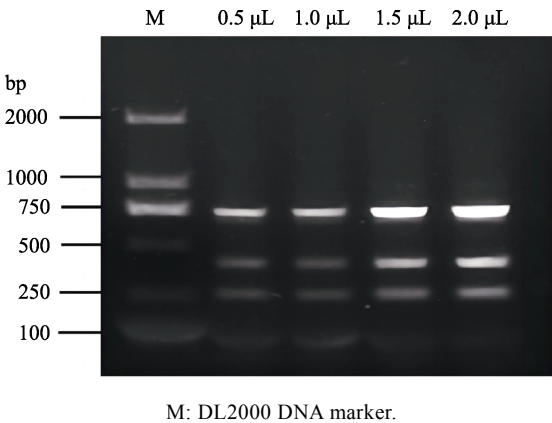


图 4 百香果复合侵染情况及相应样品检出数量
Fig. 4 *P. edulis* compound infestation and the number of corresponding samples detected

和 CMV 建立多重 RT-PCR 扩增体系。设置不同引物浓度进行扩增,结果显示引物加入量为 0.5~2 μ L 时,3 种病毒均能扩增出目的条带,因此为节约成本,选取引物加入量为 0.5 μ L (反应终浓度为 2.0 mmol/L) 为最佳引物浓度 (图 5)。采用优化后的引物浓度对多重 RT-PCR 体系的退火温度进行筛选,结果显示当退火温度为 54 $^{\circ}$ C 时,3 种病毒扩增的目的条带清晰无杂带,因此选取 54 $^{\circ}$ C 为多重 RT-PCR 体系的最优退火温度 (图 6)。采用优化后的引物浓度和退火温度对多重 RT-PCR 体系的循环次数进行筛选,结果显示当循环次数为 35 次和 40 次时,扩增出的条带较清晰,因此为节约循环时间,选取循环次数 35 次为最佳循环次数 (图 7)。



M: DL2000 DNA marker.
图 5 不同引物浓度下 EAPV、TeMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 扩增

Fig. 5 Amplification of EAPV, TeMV and CMV by multiplex RT-PCR with different concentrations of primers

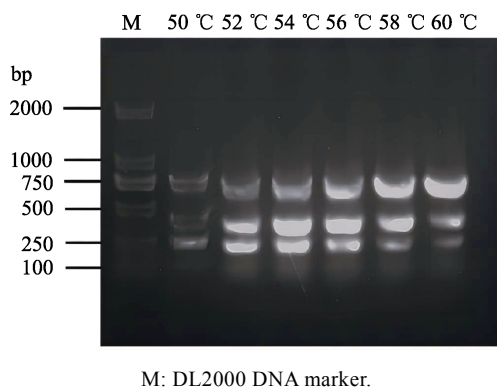


图 6 不同退火温度下 EAPV、TeMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 扩增

Fig. 6 Amplification of EAPV, TeMV and CMV by multiplex RT-PCR with different annealing temperatures

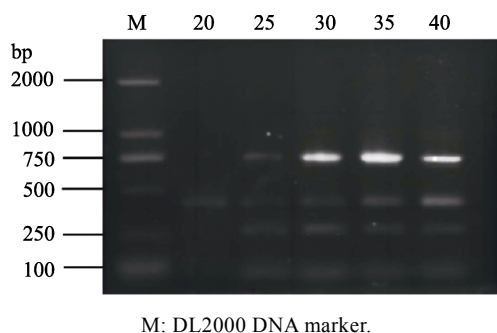


图 7 不同循环次数下 EAPV、TeMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 扩增

Fig. 7 Amplification of EAPV, TeMV and CMV by multiplex RT-PCR with different cycle index

综上所述，多重 RT-PCR 的最佳反应体系为：2×Taq PCR MasterMix II 10 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 0.5 μL，无菌 ddH₂O 补足至 20 μL。最佳反应条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，54 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 50 s，循环 35 次；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。如图 8 所示，利用优化后的多重 RT-PCR 体系对 12 份 EAPV、TeMV 和 CMV 复合感染的样品进行扩增，条带位置与预期大小吻合，检测结果

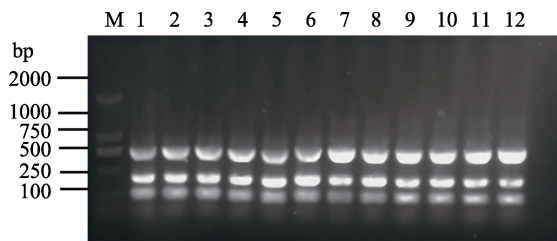


图 8 部分百香果样品的 EAPV、TeMV 和 CMV 多重 RT-PCR 病毒检测

Fig. 8 Multiplex RT-PCR (EAPV, TeMV and CMV) virus detection on selected *P. edulis* samples

果与单一 RT-PCR 扩增结果一致，因此该体系适用于 EAPV、TeMV 和 CMV 的多重检测。

3 讨论

3.1 贵州百香果病毒的复合感染情况

目前，国内外报道能感染百香果的病毒高达 44 种^[16]，但对其复合侵染的研究较少。谢慧婷等^[17]在广西百香果上检测出 3 种病毒，存在 4 种复合侵染类型，复合侵染率为 34.30%；陈礼浪等^[16]在海南百香果上检测出 7 种病毒，存在 32 种复合侵染类型，以 2~4 种病毒复合侵染为主，复合侵染率达 78.91%。本研究对贵州百香果主要种植区进行检测，共检测到 7 种病毒及 24 种复合侵染类型，3~5 种复合侵染类型占比较大，复合侵染率达 94.77%。其中 EAPV、TeMV 和 CMV 的总检出率高达 78.43%~96.08%，在 5 个百香果主要种植区都有检出，且在 11 种复合侵染类型中普遍存在，因此，这 3 种病毒为侵染贵州百香果主要种植区的优势病毒。

此外，本研究首次在百香果上检测出 PVY。PVY 最早发现于英国的马铃薯上^[18]，我国于 1950 年在烟草上首次发现^[19]，该病毒传播方式多样，主要以蚜虫为媒介进行传播，也可以通过汁液摩擦和嫁接等方式传播。PVY 的寄主种类繁多，可侵染茄科、豆科和藜科 34 个属 170 余种植物，严重影响植物品质及产量^[20]。PVY 与 EAPV、TeMV、PaMV 等常侵染百香果的病毒均属于马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*)，本研究通过孙琦等^[15]已建立的 PVY 检测体系，在百香果上首次检测出 PVY，说明百香果是 PVY 的新宿主，这为百香果病毒病监测及防控提供了依据，为后续的相关研究提供技术支持。鉴于病毒发生和传播的特性，后续应加强对该病毒的监管与检测，防止其大面积传播。

多重 RT-PCR 法可同时检测多种病毒，显著提高了检测效率，但目前关于百香果的多重 RT-PCR 报道较少。本研究前期利用单一 RT-PCR 法检测出贵州百香果的主要优势病毒为 EAPV、TeMV 和 CMV，这 3 种病毒在福建^[10]、海南^[16]、广西^[17]等地也被广泛检出，是感染国内百香果的主要病毒。本研究以单一 RT-PCR 检测为基础，对引物浓度和退火温度等因素进行了筛选优化，建立了这 3 种病毒的多重 RT-PCR 体系，为百香果病毒的快速检测提供了技术支持。

病毒侵染百香果后会呈现不同的田间症状，

植物的表型症状会随宿主种类、生长状况、生长年龄、感染阶段和外部条件不同而变化,在某些情况下,植物病毒病的症状与病虫害的发生、植物营养缺乏、逆境胁迫和除草剂损害的症状非常相似,难以辨别^[21]。本研究中百香果病毒病复合侵染情况严重,存在“一毒多症”和“多毒一症”的情况,仅通过表型观察难以区分,因此在田间防治过程中,遇到疑似病毒感染植株应及时送检,以明确病毒种类,及时防治,从源头上控制该病害的发生及传播。值得注意的是,病毒病在新果园也有发生,说明苗木带病,为了贵州百香果产业的可持续性发展,培育本地脱毒苗并实行严格的种苗检验检疫措施刻不容缓。

3.2 贵州百香果的病毒序列多样性分析

序列分析对病毒溯源有一定参考价值,通过构建进化树发现, EAPV、TeMV、PaMV、PLV、TuMV 均与中国各省份的百香果病毒分离物在同一亚组,存在一定的地理聚集性,这说明它们可能具有相同的进化来源,病毒是通过苗木的跨区域引种销售而实现的远距离传播。其中, EAPV-GZ 分离物与台湾百香果分离物(KP114136)一致性最高,与大陆首次检测的百香果 EAPV 分离物(ON641738)亲缘关系较近,因此合理推测大陆地区发现的 EAPV 是从台湾引种时传入的,这与谢丽雪等^[7]的研究结果一致。TeMV-GZ 与广西百香果亲缘关系较近,在本次采样的 5 个县均有检出,严佳文等^[12]和任羽羽等^[13]也先后检测到,这说明 TeMV-GZ 在贵州百香果中已经广泛流行。

将测序结果与 NCBI 数据库进行比对时发现, CMV 和 PVY 与相应参考序列的相似性较低,经构建进化树可以看出, CMV 和 PVY 分别与西班牙甜瓜和卢旺达辣椒的病毒分离物亲缘关系较近,这说明病毒来源和感染途径复杂,合理推测这也是 PVY 在贵州被首次发现的原因:(1)病毒的引种携带。据余亚白等^[22]报道,国内百香果品种多引自于台湾,而台湾百香果均引自于海外,其中不乏民间个人引进,由于病毒病潜伏期长,缺乏引种检疫意识,病毒可能通过国外引种时传入。(2)病毒的跨物种传播。CMV 和 PVY 的自然寄主类型丰富,传播方式多样,蚜虫等媒介可从通过啃食该病毒的其他宿主将其传播至百香果中。因此在百香果的种植过程中,除了要增强引种检疫意识,还要加强对传播媒介的防治,把进

化关系较近的物种在同一地区分开种植,以免造成病毒的大面积播散。

近年来,在农村产业发展的推动下,贵州百香果产业实现了高速发展,现种植规模已跃居全国第三。百香果作为贵州的特色优势水果,对巩固脱贫攻坚成果和深入实施乡村振兴战略具有深刻的意义。本研究对贵州百香果主要种植区的病毒侵染情况进行综合分析,对该产业的健康可持续发展具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 黄爱军, 王莹, 胡笑林. 西番莲病毒病研究进展[J]. 中国南方果树, 2019, 48(3): 141-146.
HUANG A J, WANG Y, HU X L. Progress in research on *Passiflora edulis* virus disease[J]. South China Fruits, 2019, 48(3): 141-146. (in Chinese)
- [2] 王力钧. 西番莲综合开发利用研究[J]. 热带林业, 2005, 33(2): 25-26.
WANG L J. Research on the comprehensive development and utilization of *Passiflora edulis*[J]. Tropical Forestry, 2005, 33(2): 25-26. (in Chinese)
- [3] 孙琪, 王亚楠, 张焕, 许玉兰, 蔡年辉, 唐军荣. 西番莲组织培养技术研究[J]. 种子, 2018, 37(7): 78-81.
SUN Q, WANG Y N, ZHANG H, XU Y L, CAI N H, TANG J R. Study on the tissue culture technology of *Passiflora edulis* Sims[J]. Seed, 2018, 37(7): 78-81. (in Chinese)
- [4] 陈雪梅, 刘夏蕾, 林标声, 陈小红, 黎英. 百香果果皮主要有效成分连续提取工艺[J]. 热带作物学报, 2023, 44(2): 405-418.
CHEN X M, LIU X L, LIN B S, CHEN X H, LI Y. Continuous extraction technology of main active components of passion fruit peel[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(2): 405-418. (in Chinese)
- [5] 张中润, 肖丽燕, 冯红玉, 程子硕, 高玲. 海南百香果病虫害种类调查鉴定及其发生危害[J]. 热带作物学报, 2022, 43(10): 2114-2121.
ZHANG Z R, XIAO L Y, FENG H Y, CHENG Z S, GAO L. Investigation and identification of diseases and pests of passion fruit in Hainan and the damages[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(10): 2114-2121. (in Chinese)
- [6] 罗金水, 周知恩, 王隆桑, 陈振东, 吴祖建, 林荣耀. 西番莲病毒病的发生与防控[J]. 东南园艺, 2019, 7(6): 36-40.
LUO J S, ZHOU Z E, WANG L S, CHEN Z D, WU Z J, LIN R Y. Occurrence and prevention and control suggestion of virus diseases of passion fruit[J]. Southeastern Horticulture, 2019, 7(6): 36-40. (in Chinese)

- [7] 谢丽雪, 张立杰, 张小艳, 郑姗, 李韬. 福建西番莲上首次检出东亚西番莲病毒[J]. 园艺学报, 2018, 45(8): 1587-1594.
XIE L X, ZHANG L J, ZHANG X Y, ZHENG S, LI T. First report of East Asian *Passiflora* virus infecting *Passiflora edulis* in Fujian, China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(8): 1587-1594. (in Chinese)
- [8] 谢丽雪, 张小艳, 郑姗, 张立杰, 李韬. 侵染西番莲的夜来香花叶病毒的分子鉴定及特异性检测[J]. 中国农业科学, 2017, 50(24): 4725-4734.
XIE L X, ZHANG X Y, ZHENG S, ZHANG L J, LI T. Molecular identification and specific detection of *Telosma* mosaic virus infecting passion fruit[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(24): 4725-4734. (in Chinese)
- [9] 焦楠, 朱宁, 程春振, 林玉玲, 李汉生, 陈发兴, 赖钟雄. 西番莲 TeMV 和 CMV 双重 RT-PCR 检测体系的建立及应用[J]. 果树学报, 2019, 36(7): 947-953.
JIAO N, ZHU N, CHENG C Z, LIN Y L, LI H S, CHEN F X, LAI Z X. Establishment and application of the *Telosma* mosaic virus and Cucumber mosaic virus duplex RT-PCR system in passionfruit[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(7): 947-953. (in Chinese)
- [10] 焦楠. 西番莲快繁体系建立及脱毒技术研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
JIAO N. Establishment of a fast breeding system and detoxification technology for *Passiflora edulis*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [11] CARDONA D, HIGUITA M, POSADA J, GALLO Y, MARIN M, GUTIERREZ P. Viruses infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in southwestern Antioquia, Colombia[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2022, 55(12): 1394-1409.
- [12] 严佳文, 袁启凤, 解璞, 王立娟, 马玉华, 王正媛. 利用小 RNA 测序技术检测贵州西番莲病毒[J]. 热带作物学报, 2019, 40(8): 1577-1584.
YAN J W, YUAN Q F, XIE P, WANG L J, MA Y H, WANG Z Y. Identification of viruses infecting *Passiflora edulis* in Guizhou province by small RNA sequencing[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(8): 1577-1584. (in Chinese)
- [13] 任羽羽, 王立娟, 陈楠, 袁启凤, 马玉华. 三种百香果病毒在贵州的发生分布[J]. 中国南方果树, 2022, 51(3): 79-82.
REN Y Y, WANG L J, CHEN N, YUAN Q F, MA Y H. Distribution of the occurrence of three *Passiflora edulis* viruses in Guizhou[J]. South China Fruits, 2022, 51(3): 79-82. (in Chinese)
- [14] 宋若楠, 侯永翔, 崔梦迪, 冯岩, 韩群鑫, 饶雪琴. 广东百香果病毒的检测[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2020, 33(1): 11-15.
SONG R N, HOU Y X, CUI M D, FENG Y, HAN Q X, RAO X Q. Detection of virus infecting passion fruit in Guangdong[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2020, 33(1): 11-15. (in Chinese)
- [15] 孙琦, 张春庆. PVY^N 与 PVY^O 病毒 RT-PCR 快速检测体系研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 213-216.
SUN Q, ZHANG C Q. Studies on the methods of detecting PVY^N and PVY^O by RT-PCR[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(1): 213-216. (in Chinese)
- [16] 陈礼浪, 杨天章, 蔡儒平, 林小漫, 邓南康, 车海彦, 林雅婷, 孔祥义. 海南西番莲主要病毒种类的分子检测与鉴定[J]. 园艺学报, 2022, 49(8): 1785-1794.
CHEN L L, YANG T Z, CAI R P, LIN X M, DENG N K, CHE H Y, LIN Y T, KONG X Y. Molecular detection and identification of viruses from *Passiflora edulis* in Hainan[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(8): 1785-1794. (in Chinese)
- [17] 谢慧婷, 李战彪, 崔丽贤, 秦碧霞, 刘丽辉, 林珊宇, 陈锦清, 蔡健和. 广西局地西番莲病毒病的病原鉴定及优势病毒分析[J]. 植物病理学报, 2020, 50(4): 387-393.
XIE H T, LI Z B, CUI L X, QIN B X, LIU L H, LIN S Y, CHEN J Q, CAI J H. Identification of pathogens and analysis of the dominant viruses of passion fruit virus disease in some areas of Guangxi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(4): 387-393. (in Chinese)
- [18] SMITH K M. On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1931, 109(762): 251-267.
- [19] 张诺妮, 曹洋, 梅运鹏, 韩猛, 姚峰, 何文勤, 杨鹏, 杨章明, 王阳, 安德荣. 烟草马铃薯 Y 病毒病发生规律及生物防治研究进展[J]. 北方农业学报, 2022, 50(2): 110-116.
ZHANG N N, CAO Y, MEI Y P, HAN M, YAO F, HE W Q, YANG P, YANG Z M, WANG Y, AN D R. Research progress on the occurrence pattern and biological control of tobacco potato virus Y[J]. Journal of Northern Agriculture, 2022, 50(2): 110-116. (in Chinese)
- [20] 杨森. 马铃薯 Y 病毒病检测方法及防治策略研究进展[J]. 世界农药, 2022, 44(10): 15-20.
YANG S. Research progress on detection methods and control strategies of potato Y virus disease[J]. World Pesticide, 2022, 44(10): 15-20. (in Chinese)
- [21] 阎世江, 郭建恩. 植物病毒病的防治研究进展[J]. 天津农

林科技, 2022(6): 26-32.

YAN S J, GUO J E. Advances in research on the control of plant viral diseases[J]. Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry, 2022(6): 26-32. (in Chinese)

[22] 余亚白, 陈源, 王琦, 谢鸿根, 赖呈纯. 台湾果树品种的

引种、改良与种植[J]. 福建农业科技, 2008, 5(1): 92-94.

YU Y B, CHEN Y, WANG Q, XIE H G, LAI C C. Introduction, improvement and planting of fruit tree varieties in Taiwan[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2008, 5(1): 92-94. (in Chinese)