

广东省国兰病毒病害调查及 CymMV 和 ORSV 基于 *cp* 基因的系统进化分析

任 锐 魏永路 朱根发 杨凤玺*

(广东省农业科学院环境园艺研究所, 广东省园林花卉种质创新与利用重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为调查广东省国兰病毒病发生情况, 采用双抗体夹心-酶联免疫吸附测定(double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)法对采集自广州市、汕头市和韶关市兰花主产区的 53 份具有典型病毒病症状的国兰叶片进行检测, 选取 35 份病叶应用 RT-PCR 技术对检测结果进行验证, 并基于 *cp* 基因序列对检测到的病毒进行系统进化分析。DAS-ELISA 检测结果显示, 53 份病叶中有 44 份检出病毒, 总检出率为 83.02%; 其中, 有 14 份仅检出建兰花叶病毒(Cymbidium mosaic virus, CymMV), 有 19 份仅检出齿兰环斑病毒(Odontolossus ring spot virus, ORSV), 有 11 份检出 CymMV 和 ORSV 复合侵染, 检出率分别为 26.42%、35.85% 和 20.75%。RT-PCR 检测结果显示, 35 份病叶中有 30 份检出病毒, 总检出率为 85.71%; 其中, 有 21 份仅检出 CymMV, 有 6 份仅检出 ORSV, 有 4 份检出 CymMV 和 ORSV 复合侵染, 检出率分别为 60.00%、17.14% 和 11.43%, 但未检测到其它病毒。表明广东省国兰病毒病害主要由 CymMV 和 ORSV 侵染引起。序列和系统进化分析显示, 来源于不同地区和寄主的 CymMV 和 ORSV 分离物的 *cp* 基因序列极为保守, CP 氨基酸序列相似性分别大于 97.31% 和 93.67%, 且 CymMV 和 ORSV 多样性种群的分化与寄主种属和地理隔离关系不大。

关键词: 建兰花叶病毒; 齿兰环斑病毒; RT-PCR; DAS-ELISA; 系统进化分析; 广东省

Investigation of Chinese *Cymbidium* viral disease, and phylogenetic analysis of *cp* gene of Cymbidium mosaic virus and Odontolossus ring spot virus in Guangdong Province

REN Rui WEI Yonglu ZHU Genfa YANG Fengxi*

(Guangdong Key Laboratory of Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Environmental Horticulture Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: To investigate the viral disease of Chinese *Cymbidium* in Guangdong Province, the double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was used to detect the virus in 53 samples of Chinese *Cymbidium* leaves with typical viral-symptoms, which were collected from the main orchid producing regions in Guangzhou, Shantou and Shaoguan cities. Thirty-five out of the 53 samples were selected to verify the DAS-ELISA results by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Additionally, sequence and phylogenetic analysis of these viral isolates detected in this study were constructed based on the deduced amino acid sequences of *cp* gene. DAS-ELISA results revealed that 44 out of the 53 samples were virus infected, with a detection rate of 83.02%. Thereinto, 14, 19 and 11 samples were detected to be infected with Cymbidium mosaic virus (CymMV), Odontolossus ring spot virus (ORSV), and CymMV combined with ORSV, with detection rates of 26.42%, 35.85% and

基金项目: 中国博士后科学基金(2018M643033), 广东省公益研究与能力建设项目(2019B030316033), 广东省农业科学院院长基金(201804B)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yangfengxi@gdaas.cn

收稿日期: 2019-06-04

20.75%, respectively. RT-PCR results showed that 30 out of the 35 samples were infected with virus (detection rate was 85.71%). Among them, there were 21, 6 and 4 samples were detected to be infected with CymMV (60.00%), ORSV (17.14%), and CymMV combined with ORSV (11.43%) respectively, while no other virus was detected. The above results indicated that CymMV and ORSV were still main viral pathogens of Chinese *Cymbidium* in Guangdong Province. Sequence and phylogenetic analysis showed that *cp* genes of CymMV and ORSV isolates collected from different regions and various hosts were highly conserved, and the sequence similarities of the deduced amino acid were greater than 97.31% and 93.67%, respectively. The differentiations of diverse viral populations had little relationship with host species and geographical isolation.

Key words: Cymbidium mosaic virus; Odontolossus ring spot virus; RT-PCR; DAS-ELISA; phylogenetic analysis; Guangdong Province

兰花一般指兰科植物,有 801 属共 3 万余种,是被子植物中最大的科(张殷波等,2015),也是全球销售额最大的观赏花卉之一。兰科植物中多数地生种原产于中国,又称国兰,有两千多年的栽培历史,主要包括墨兰、建兰、春兰和蕙兰等 8 大类(张殷波等,2015)。国兰以其浓厚的文化内涵、极高的观赏价值和经济价值在国内外市场上占有重要地位。但在兰花的生长过程中病毒病、根(茎)腐病和炭疽病危害严重。兰花病毒病又称拜拉斯病,有兰花癌症之称,常造成叶片褪绿、干缩、坏死,植株矮化、畸形,以及花朵变色等症状,严重影响其生长发育和观赏价值。受病毒侵染的兰花全身带毒、终生带毒,而且还会通过蚜虫、刀剪、盆具等媒介交叉传染扩散(郑平等,2001)。频繁的国际和国内贸易、种质交换以及分株繁殖模式也导致兰花病毒病大范围传播,进而影响兰花的进出口贸易,造成极大的经济损失。但目前国际上还没有防治植物病毒病的有效药剂,因此有效检测和防控病毒病,做到早发现、早清除,是目前防控兰花病毒病的主要手段,对国兰产业化发展十分重要。

从 20 世纪 40~50 年代澳大利亚首次报道蕙兰属病毒病以来,国内外学者对兰花病毒病的流行规律和病毒种类及寄主范围等进行了广泛研究(Jensen, 1952)。目前,可侵染兰花的病毒多达 30 种,主要包括建兰花叶病毒(Cymbidium mosaic virus, CymMV)、齿兰环斑病毒(Odontolossus ring spot virus, ORSV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、辣椒褪绿病毒(Capsicum chlorosis virus, CaCV)和落葵皱纹花叶病毒(Basella rugose mosaic virus, BaRMV)等,且有逐年增加的趋势(Wong, 2000; Koh et al., 2014)。Jensen (1970)发现荷兰和美国的兰花病毒病主要是由 CymMV 和 ORSV 单独

或复合侵染引起的;Hu et al. (1993)检测结果表明,美国夏威夷石斛兰病毒病主要由 CymMV 和 ORSV 引起,少数由番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)引起;Khentry et al. (2006)研究发现 CymMV 是引起泰国石斛兰病毒病的主要病原。在国内,刘志昕等(1994)和潘俊松等(1997)分别从卡特兰和石斛兰病株中首次分离到了 ORSV 和 CymMV,并成功制备出用于病毒检测的抗体血清;肖火根和郑冠标(1996)从广东省墨兰、文心兰、蝴蝶兰和万代兰等兰花上检测到 CymMV 和 ORSV;郑平等(2001)对广东、福建、四川、云南、海南、江苏、江西等省的 17 个市县共 2 871 份植株样本进行了 CymMV 和 ORSV 的检测,发现沿海地区如广东、福建、海南、江苏等省的兰花病毒感染率明显高于内陆地区如四川、云南、江西等省,蝴蝶兰等洋兰的病毒感染率普遍高于国兰,人工栽培兰花的病毒感染率高于野生兰花;柳爱春等(2009)对浙江省 139 个兰科样品和 8 个百合科样品的检测结果表明,有 31.7 % 的样品中检出 CymMV,有 28.8% 的样品中检出 ORSV;曾燕君等(2009)调查发现海南省兰花病毒病主要由 CymMV、ORSV 和两者复合侵染引起,且发病率与兰花龄期呈正相关,文心兰、石斛兰的发病率显著高于蝴蝶兰。但由于检测技术有限,国内对兰花,特别是国兰病毒病的检测主要侧重于 CymMV 和 ORSV,而对其它潜在的兰花病毒报道较少。

对植物病毒病的检测方法主要包括生物学、电镜技术、血清学和分子生物学等方法,如反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和双抗体夹心-酶联免疫吸附测定(double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)分别是应用最广泛的分子生物学和血清学病毒检测手段。RT-PCR 技术具有检测

灵敏度高、特异性强等优点,能同时对多种病毒(Hu et al., 1993;周国辉等,2004;曾燕君等,2009)或微量病毒(涂小云等,2017)进行检测,但其对操作技术和仪器设备要求较高。DAS-ELISA 是应用广泛的血清学检测方法,特异性强且易于标准化,但抗体制备成本高且存在假阳性。因此,为了能更准确地检测国兰病毒病样本中所含病毒种类,本研究同时采用 RT-PCR 和 DAS-ELISA 技术对广东省国兰主产区采集的国兰病毒病样进行检测,并基于外壳蛋白(coat protein, CP)基因序列对检测到的病毒进行系统进化分析,明确其遗传变异情况,以期为国兰病毒病防控技术体系的建立提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2018年4—7月从广东省国兰主产区兰圃共采集具有花叶、干缩和不规则坏死斑点的疑似病毒病症状(图1)的国兰叶片53份,其中,广州市市区24份(GZ001、GZ002、GZ003、GZ-2-1、GZ-2-2、GZ-2-3、GZ-2-4、GZV-1、GZV-2、GZV-3、GZV-4、GZV-5、GZV-6、GZV-7、GZV-8、GZV-9、GZV-10、GZV-11、GZV-12、GZV-13、GZV-14、GZV-15、GZV-16和GZV-17)、广州市增城区20份(ZC005、ZC-6、ZC-7、ZC-8、ZC-9、ZC-10、ZC-11、ZC-12、ZC-13、ZC-15、ZC-16、ZC-17、ZC-19、ZC-20、ZC-21、ZC-23、ZC-28、ZC-29、ZC-30和ZC-31)、汕头市6份(ST-1、ST-2、ST-3、ST-4、ST-5和ST-6)和韶关市翁源县3份(WY001、WY002和WY003)。病样存放于冻存管中,液氮速冻后于-80℃保存备用。

供试植物:本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 由本实验室保存并提供,于16 h光照(25℃)/8 h黑暗(20℃)、相对湿度50%~80%的培养室中培养。健康的无病毒国兰叶片采集自广东省农业科学院环境园艺研究所兰花种质资源圃组培脱毒苗。

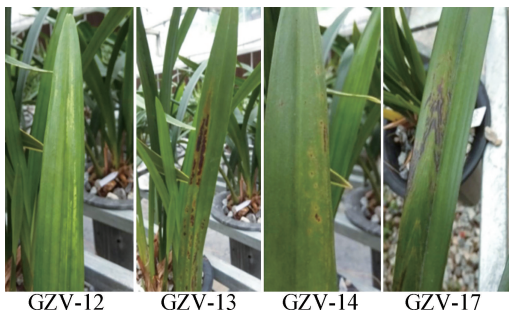


图1 采集的疑似感染病毒病国兰代表性叶片

Fig. 1 Collected representative Chinese *Cymbidium* leaves with suspected viral symptoms

试剂:DAS-ELISA 试剂盒(包括包被抗体、酶标抗体、酶标板及相关试剂)和含有 CymMV、ORSV、CMV、CaCV、BaRMV 阳性对照(含有各种病毒的烟草叶片冻干粉末),美国 Advanced Cell Diagnostics 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞和总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Oligo(dT)引物、DNA 聚合扩增酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 和 pMD18-T 载体,宝日医生物技术(北京)有限公司;DNA 胶回收纯化试剂盒和质粒小量提取试剂盒,爱思进生物技术(杭州)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

仪器:5810R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 股份公司;iMark 酶标仪、T100 PCR 扩增仪和 Sub-Cell 核酸水平电泳系统,美国 Bio-Rad 公司;JY04S-3C 凝胶成像系统,北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病样中 CymMV 和 ORSV 的 DAS-ELISA 检测

按照 DAS-ELISA 试剂盒的操作说明书,对采集的53份具有疑似病毒病症状的国兰叶片进行 CymMV 和 ORSV 检测。首先,用包被抗体缓冲液(无水碳酸钠 1.60 g、碳酸氢钠 2.92 g、叠氮化钠 0.2 g, ddH₂O 定容至 1 L, pH 9.6)按体积比 1:400 稀释包被抗体,混匀后按每孔 100 μ L 加入到酶标板中并放在保湿盒里,4℃过夜孵育。将每份待测病叶准确称取 0.1 g 置于研钵中,按质量体积比 1:10 加入 SB1 抽提缓冲液(Ⅱ级鸡卵白蛋白 2.0 g、相对分子量 24 000~40 000 聚乙烯吡咯烷酮 10.0 g、无水亚硫酸钠 1.3 g、叠氮化钠 0.2 g、吐温-20 10.0 mL, 1×PBST 缓冲液定容至 1 L, pH 7.3)研磨至匀浆,转移至 1.5 mL 离心管中,于冰上静置,直至匀浆分层出现上清液。倒掉包被抗体缓冲液,用 PBST 缓冲液洗板 4~6 次,每孔中加入 100 μ L 待测样品抽提上清液;同时分别设置 CymMV 或 ORSV 阳性对照,以健康的无病毒国兰叶片为阴性对照,每孔加入 100 μ L;当检测 CymMV 时只加 CymMV 阳性对照,检测 ORSV 时只加 ORSV 阳性对照;每个样品 3 次重复,放在保湿盒内室温 21~24℃ 条件下孵育 2.5 h;然后倒掉酶标板内的液体,用 PBST 缓冲液洗板 6~8 次,用 ECB1 酶标抗体缓冲液(小牛血清白蛋白 2.0 g、相对分子量 24 000~40 000 聚乙烯吡咯烷酮 10.0 g、叠氮化钠 0.2 g, 1×PBST 缓冲液定容至 1 L, pH 7.3),按体积比 1:400 稀释酶标抗体,混匀后按每孔 100 μ L 加入到酶标板中,放在

保湿盒内于室温21~24℃孵育2.5 h;再次倒掉酶标板内的液体,用PBST缓冲液洗板6~8次,用PNP底物缓冲液(二乙醇胺97.0 mL、氯化镁0.1 g、叠氮化钠0.2 g,ddH₂O定容至1 L,用盐酸调整pH至9.8)和底物4-硝基苯酚磷酸酯配制浓度为1 mg/mL的底物溶液,混匀后按每孔100 μL加入到酶标板中,放在保湿盒里在避光、21~24℃条件下反应20~30 min,再加入3 mol/L的NaOH 50 μL终止反应。利用酶标仪在405 nm波长下测定OD值。在确保对照孔OD值应在产品质量控制范围内(底物孔OD值<0.15;阳性对照OD值/阴性对照OD值>10.0)的情况下,根据以下公式判断样品检测结果是否为阳性: $P/N=(P-B)/(N-B)$ 。其中, P/N 为样品与阴性对照OD值的比值, P 、 N 和 B 分别代表每个样品、阴性对照和空白对照的3个重复孔的平均实测OD值。 $P/N<2.0$ 判为阴性, $P/N\geq 2.0$ 判为阳性。

1.2.2 供试病样中5种病毒的RT-PCR检测

为了验证DAS-ELISA检测的准确性,以及确定不含CymMV和ORSV、但表现病毒病症状的叶片所含病毒类别,从53份病叶样品中选择35份用于CymMV、ORSV、CMV、CaCV和BaRMV的RT-PCR检测。根据NCBI数据库已公布的CymMV和ORSV基因组序列,选择保守区段,用Primer Premier 5.0软件设计扩增病毒cp基因的特异性引物,并用谭建锡等(2017)设计的CMV、CaCV和BaRMV特异性引物(表1),对35份病叶样品进行5种病毒的RT-PCR检测。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司

合成。

选取健康的2叶期本氏烟草幼苗,用摩擦接种法分别接种CymMV、ORSV、CMV、CaCV和BaRMV阳性对照样品,接种10~14 d后分别采集具有典型病毒病症状的本氏烟草叶片作为阳性对照,以健康的无病毒国兰叶片为阴性对照。参照总RNA提取试剂盒说明书分别单独提取所选35份病叶、阳性对照和阴性对照的植物总RNA。用Oligo(dT)引物和Prime Script II™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行第一链cDNA的合成。以反转录cDNA为模板,采用各病毒cp基因及参考基因Ubiquitin特异性引物(表1)进行PCR扩增。50 μL反应体系:2.5 mmol/L 10×PCR缓冲液5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、10 μmol/L正反向引物各1 μL、反转录模板cDNA 2 μL、2.5 U/μL Taq DNA聚合酶0.5 μL,ddH₂O补足至50 μL。反应条件:94℃预变性4 min;94℃变性45 s,54~60℃退火45 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃再延伸10 min。取3 μL PCR产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测。若各样品PCR扩增产物能检测到Ubiquitin基因目的条带,则说明cDNA模板正常;若各病毒阳性对照样品的PCR扩增产物能分别检测到其所对应的病毒特异性片段,则说明用于CymMV、ORSV、CMV、CaCV和BaRMV的RT-PCR检测引物正常;若各待测样品的PCR扩增产物能检测到与CymMV、ORSV、CMV、CaCV或BaRMV阳性对照样品一致的条带,则说明该待测样品含有其所对应的病毒,反之则不含该病毒。

表1 用于CymMV、ORSV、CMV、CaCV和BaRMV的RT-PCR检测引物

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR detection of CymMV, ORSV, CMV, CaCV and BaRMV

病毒/基因 Virus/gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ Melting temperature	产物大小/bp Product size
CymMV	PCymMV-F	CCTGGCGAGGGTTAAGTTAC	62	780
	PCymMV-R	GCCAGTAGTGGAACAAACT	58	
ORSV	PORSV-F-1	AATGGTGTAGTGATATTCG	54	606
	PORSV-R-1	CCACTATGCATTATCGTATG	56	
CMV	Cm(F1)	GATTCAGTCACKGANTWYGATAAG	56	494
	Cm(R1)	CTGGATGGACAACCCGTTCA	62	
BaRMV	Ba(F1)	GAGCGGTAGGATCAGGAAAGT	53	369
	Ba(R1)	CTGGTGGTGTGCTGAAACCT	53	
CaCV	Ca(F1)	GGTGCAAGGCCTTTAATGCTRGA	56	236
	Ca(R1)	GAKGATTGGACTTTTAAGAGAA	54	
Ubiquitin	Ubiquitin-F	CCGGATCAGCAAAGGTTGA	58	110
	Ubiquitin-R	AAGATTTGCATCCCTCCCC	58	

1.2.3 CymMV、ORSV cp基因序列测定与系统进化分析

选择仅检出CymMV的分离物ZC29、ZC17、

ZC23、GZV013和GZV015,仅检出ORSV的分离物GZV009、GZV005、GZV006、WY002、WY003和

ZC005 的 RT-PCR 扩增产物,用 DNA 胶回收纯化试剂盒进行割胶回收和纯化。然后把纯化目的片段连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆摇菌,经菌液 PCR 检测后,选择 3~5 个正确的单克隆摇菌培养,用质粒小量提取试剂盒提取质粒,送华大基因生物科技(深圳)有限公司进行测序。用 NCBI 网站的 ORF finder 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对所测 CymMV 和 ORSV 的 *cp* 基因序列的开放阅读框进行预测。从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载已报道的中国、韩国、日本和新加坡等国家和地区的部分 CymMV 和 ORSV 分离物的 *cp* 基因核苷酸序列和预测氨基酸序列。用在线软件 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对这些

下载的 CymMV 和 ORSV 的 *cp* 基因序列与本研究获得的病毒分离物 *cp* 基因序列进行一致性分析;利用 MEGA 5.10 软件对 NCBI 网站中公布的和本研究获得的 CymMV 及 ORSV 分离物进行基于 CP 氨基酸序列的系统进化分析,采用邻接法构建系统进化树,bootstrap 值为 1 000,并隐藏可信度小于 70% 的值。

2 结果与分析

2.1 病样中 CymMV、ORSV 的 DAS-ELISA 检测结果

53 份供试病样中有 44 份被检测为阳性,病毒总检出率为 83.02%,有 14 份仅检出 CymMV,有 19 份仅检出 ORSV,有 11 份检出为 CymMV 和 ORSV 复合侵染,检出率分别为 26.42%、35.85% 和 20.75% (表 2)。

表 2 广东省国兰病样中 CymMV 和 ORSV 的 DAS-ELISA 检测结果

Table 2 DAS-ELISA results of collected diseased samples of Chinese *Cymbidium* for CymMV and ORSV in Guangdong Province

采样地点 Location of sampling	样品数 No. of samples	CymMV		ORSV		CymMV+ORSV		阳性样品 总数 Total no. of positive samples	总检出率/% Total percentage
		阳性样品数 No. of posi- tive samples	检出率/% Percentage	阳性样品数 No. of posi- tive samples	检出率/% Percentage	阳性样品数 No. of posi- tive samples	检出率/% Percentage		
广州市市区 Guangzhou City	24	5	20.83	9	37.50	5	20.83	19	79.17
广州市增城区 Zengcheng District, Guangzhou	20	8	40.00	3	15.00	5	25.00	16	80.00
汕头市 Shantou City	6	1	16.67	5	83.33	0	0.00	6	100.00
翁源县 Wengyuan County	3	0	0.00	2	66.67	1	33.33	3	100.00
总计 Total	53	14	26.42	19	35.85	11	20.75	44	83.02

其中,广州市市区 24 份病样中有 19 份被检测为阳性,病毒总检出率为 79.17%。其中,有 5 份样品 GZ-2-3、GZV-7、GZV-10、GZV-13 和 GZV-15 仅检出 CymMV,有 9 份样品 GZ-2-1、GZ-2-2、GZ-2-4、GZV-1、GZV-3、GZV-5、GZV-6、GZV-9 和 GZV-12 仅检出 ORSV,有 5 份样品 GZ001、GZ002、GZ003、GZV-2 和 GZV-11 检出 CymMV 和 ORSV 复合侵染,检出率分别为 20.83%、37.50% 和 20.83%。有 5 份样品 GZV-4、GZV-8、GZV-14、GZV-16 和 GZV-17 未检出 CymMV 或 ORSV (表 2)。

广州市增城区 20 份病样中有 16 份被检测为阳性,病毒总检出率为 80.00%。其中,有 8 份样品 ZC-10、ZC-12、ZC-17、ZC-19、ZC-21、ZC-23、ZC-28 和 ZC-29 仅检出 CymMV,有 3 份样品 ZC005、ZC-6 和 ZC-11 仅检出 ORSV,有 5 份样品 ZC-7、ZC-8、ZC-9、

ZC-13 和 ZC-15 检出 CymMV 和 ORSV 复合侵染,检出率分别为 40.00%、15.00% 和 25.00%。有 4 份样品 ZC-16、ZC-20、ZC-30 和 ZC-31 未检出 CymMV 或 ORSV (表 2)。

汕头市 6 份病样中只有样品 ST-6 检出 CymMV,其余 5 份样品 ST-1~ST-5 仅检出 ORSV,检出率分别为 16.67% 和 83.33%,病毒总检出率为 100.00%。韶关市翁源县 3 份病样中,有 2 份病样 WY002 和 WY003 仅检出 ORSV,1 份样品 WY001 检出 CymMV 和 ORSV 复合侵染,检出率分别为 66.67% 和 33.33%,病毒总检出率为 100.00% (表 2)。

2.2 供试病样中 5 种病毒的 RT-PCR 检测结果

选取 35 份疑似病样进行 CymMV、ORSV、CMV、CaCV 和 BaRMV 的 RT-PCR 检测,结果显示,除 CymMV 和 ORSV 外,未检测到其它病毒。35 份样品中扩

增多与CymMV目标片段一致的780 bp特异性条带的样品有25个,包括ST-6、ZC-30、ZC-29、ZC-28、ZC-23、ZC-21、ZC-19、ZC-17、ZC-9、ZC-12、ZC-10、ZC-8、ZC-7、GZ-2-3、ZC-31、GZV-2、GZV-7、GZV-8、GZV-10、GZV-11、GZV-12、GZV-13、GZV-14、GZV-15和GZV-16;扩增出与ORSV目标片段一致的606 bp特异性条带的样品有10个,包括ZC-8、ZC-7、ZC005、WY003、WY002、GZV-2、GZV-5、GZV-6、GZV-9和

GZV-12;同时扩增出与CymMV和ORSV目标片段一致的特异性条带的样品有4个,包括ZC-8、ZC-7、GZV-2和GZV-12;有5个样品ZC-16、GZ-2-1、GZV-4、GZV-16和GZV-17未扩增到任何目标条带(图2)。总体上看,35份病样中共有30份样品检出病毒,总检出率为85.71%;其中,有21份仅检出CymMV,有6份仅检出ORSV,有4份检出CymMV和ORSV复合侵染,检出率分别为60.00%、17.14%和11.43%。

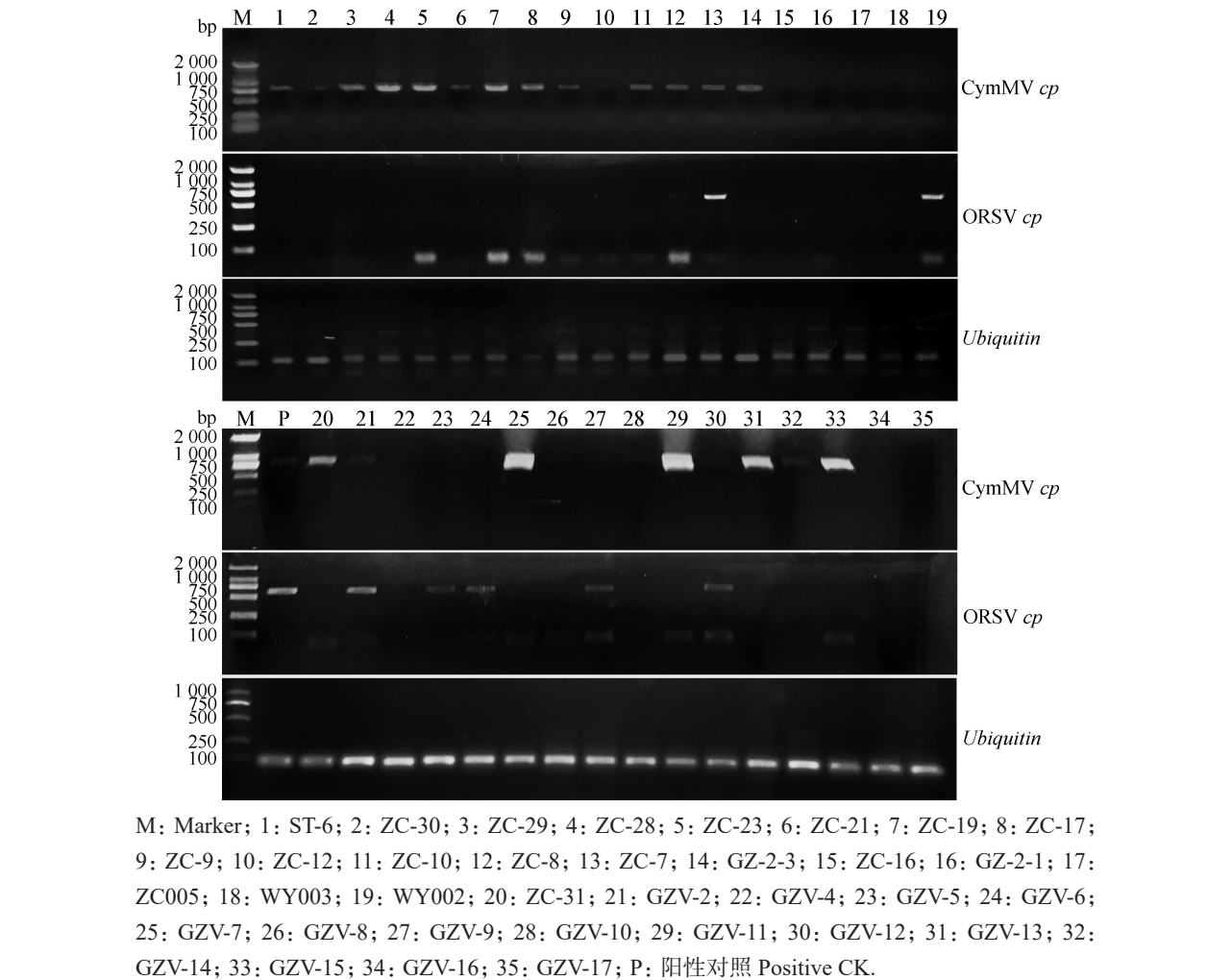


图2 广东省国兰病样中CymMV和ORSV的RT-PCR检测结果

Fig. 2 RT-PCR detection of CymMV and ORSV in the Chinese *Cymbidium* of diseased samples collected from Guangdong Province

2.3 CymMV、ORSV的cp基因序列和系统进化分析

2.3.1 CymMV的cp基因序列和系统进化分析

结合RT-PCR和DAS-ELISA的检测结果,选择仅检出CymMV的分离物ZC29、ZC17、ZC23、GZV013和GZV015进行cp基因序列及系统进化分析。结果显示,CymMV分离物的cp基因编码序列均为672 bp,预测编码由223个氨基酸组成的CP,与已报道的CymMV的cp基因序列长度一致。这些来源不同的CymMV分离物cp基因核苷酸序列及编码蛋白氨基

酸序列同源性分别为89.73%~100.00%和97.31%~100.00%。其中分离物ZC-29与GenBank中其它30个CymMV分离物的cp基因核苷酸序列相似性为89.73%~98.66%,编码蛋白氨基酸序列相似性为97.31%~100.00%;墨兰分离物ZC29、ZC17和ZC23与日本卡特兰分离物Cat、韩国文心兰分离物ONK26和中国云南兜兰分离物SMi2的CP氨基酸序列完全一致(表3)。表明cp基因序列在来自不同地区和寄主的CymMV分离物间高度保守。

表 3 本研究获得的 CymMV 分离物与 GenBank 中其它 CymMV 分离物 *cp* 基因序列相似性比较
Table 3 Similarity comparison of *cp* gene sequences of CymMV isolates obtained in the present study
with other isolates in the GenBank database

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	寄主 Host	来源地 Isolated region	序列相似性/% Sequence similarity	
				核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid
ZC29	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	100.00	100.00
ZC17	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	98.21	100.00
ZC23	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	98.21	100.00
GZV013	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	97.92	99.10
GZV015	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	97.62	99.55
Cat	AY376391.1	卡特兰属 <i>Cattleya</i>	日本 Japan	98.51	100.00
Cephalotaxus	HQ681906.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国 China	98.66	99.55
CHN-HBWH21	DQ067880.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国浙江 Zhejiang, China	90.18	98.65
Christieara Ramiah	AF405724.1	—	新加坡 Singapore	89.73	97.76
CK27	AB541536.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.07	99.55
C-LZ21	KP137372.1	虾脊兰属 <i>Calanthe</i>	日本 Japan	97.47	99.10
Cy BULBOPH MOGI CR	KX960748.1	豆兰属 <i>Bulbophyllum</i>	巴西 Brazil	94.20	99.55
CYK15	AB541548.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	90.77	98.65
Hangzhou	FJ858205.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国杭州 Hangzhou, China	97.92	99.55
Dendrobium Saleha	AF405728.1	石斛兰属 <i>Dendrobium</i>	新加坡 Singapore	96.88	97.76
gd1	AY360408.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	97.92	99.10
GDDHLC5	GU295173.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	98.07	99.55
Guizhou CP01	KF225473.1	—	中国贵州 Guizhou, China	96.88	99.10
Kagawara Red	AF405726.1	—	新加坡 Singapore	98.07	99.55
Kebun Raya Bogor	AB693983.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	印度尼西亚 Indonesia	97.47	97.31
KMMLC2	GU295171.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国昆明 Kunming, China	97.92	99.10
Korean type_2	AF016914.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.21	98.65
M2	EU314803.1	—	中国台湾 Taiwan, China	98.07	98.21
NHRIK1	AY050649.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	90.33	98.65
NIHHSK2	HQ644132.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.51	99.55
NJ-1	JQ860108.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国 China	98.21	98.65
ONK26	AB541573.1	文心兰属 <i>Oncidium</i>	韩国 South Korea	97.62	100.00
Orissa Epidendrum	AJ871374	树兰属 <i>Epidendrum</i>	印度 India	97.47	99.10
Phaius tancarvilleae	AJ564562.5	树兰属 <i>Epidendrum</i>	印度 India	97.02	96.86
SCDXZC4	GU295172.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国四川 Sichuan, China	97.62	99.10
Singapore 1	AY049770.1	火焰兰属 <i>Renanthera</i>	新加坡 Singapore	98.07	99.10
Singapore 2	AY049769.1	火焰兰属 <i>Renanthera</i>	新加坡 Singapore	98.21	99.10
skt1	AJ581997.3	卡特兰属 <i>Cattleya</i>	印度 India	98.21	98.65
SMi2	AM055640.2	兜兰属 <i>Paphiopedilum</i>	中国云南 Yunnan, China	98.66	100.00
Taiwan	AY571289.1	兰科 Orchidaceae	中国台湾 Taiwan, China	96.88	98.65

系统进化分析显示, 35 个 CymMV 分离物可聚类为 3 个类群 I、II 和 III (图 3)。类群 I 又可分为亚群 A 和 B, 本研究获得的 CymMV 分离物 ZC29 与新加坡、日本、韩国、印度和中国的 CymMV 分离物聚类于亚群 A; 另外 4 个 CymMV 分离物 ZC17、ZC23、GZV013 和 GZV015 的亲缘关系较近, 与来自

中国、韩国、日本和新加坡等国家的 CymMV 分离物聚类于亚群 B。本研究获得的 8 个分离物聚类在类群 I, 但亚群 A 和 B 中分离物的寄主却包含国兰、蝴蝶兰、卡特兰等多个不同属的植物。表明 CymMV 多样性种群的分化与寄主种类无必然联系。

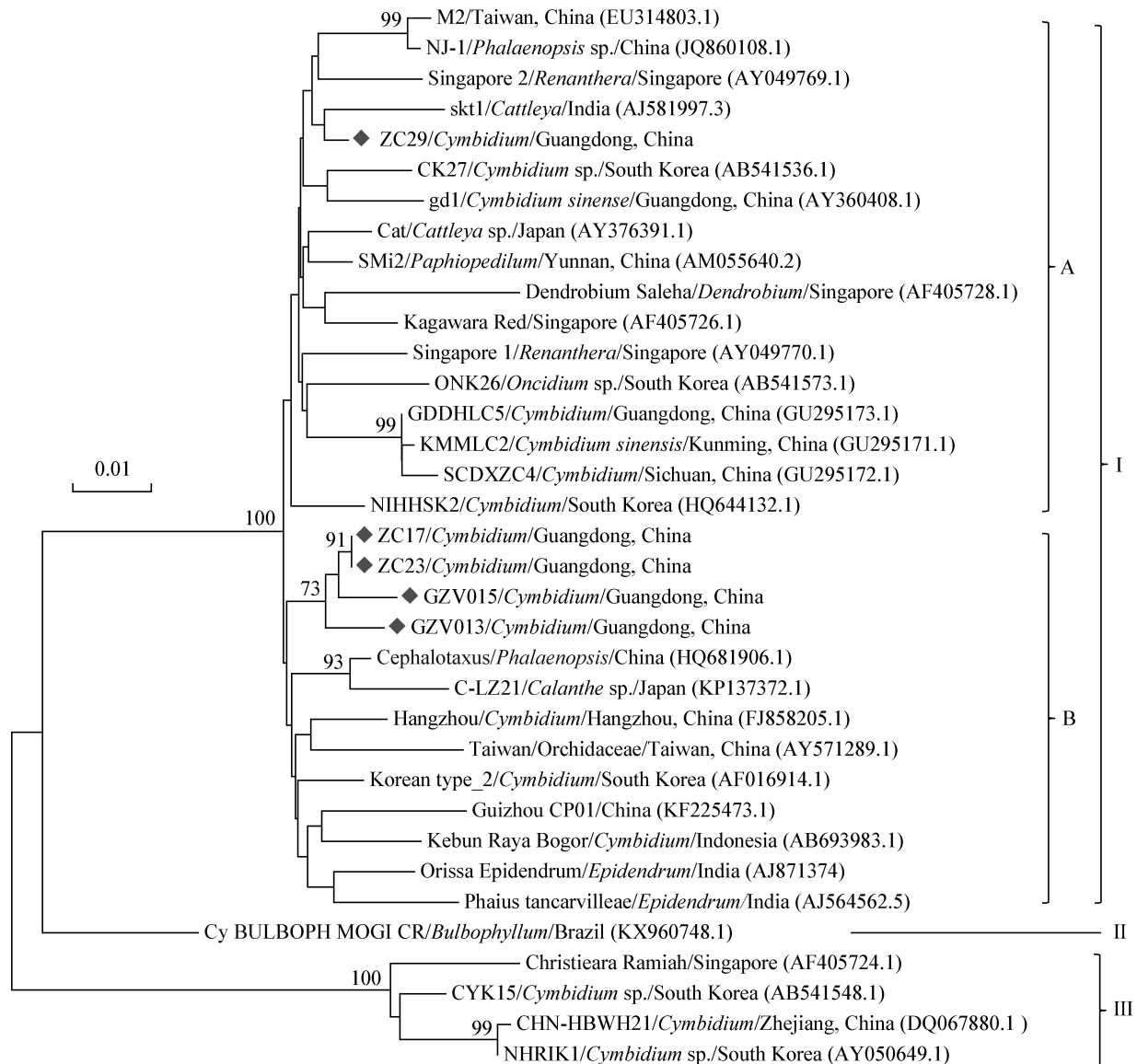


图3 基于CP氨基酸序列以邻接法构建CymMV各分离物的系统进化树

Fig. 3 The neighbor joining phylogenetic tree of CymMV isolates structured based on CP amino acid sequences

图中内容表述形式为分离物/寄主/来源(登录号)。菱形标记分离物为本研究测定序列,未显示低于70%支持率的数值。The description is represented as the isolate/host/origin (accession number). The diamond indicates the sequence obtained in this study, and bootstrap values below 70% are not shown.

2.3.2 ORSV的*cp*基因序列和系统进化分析

结合RT-PCR和DAS-ELISA检测结果,选择仅检出ORSV的分离物GZV009、GZV005、GZV006、WY002、WY003和ZC005进行*cp*基因序列与系统进化分析。结果显示,ORSV分离物*cp*基因编码序列均为477 bp,预测编码由158个氨基酸组成的外壳蛋白,与已报道的ORSV*cp*基因序列长度一致。与其它国家的37个ORSV分离物*cp*基因进行序列比对和同源性分析,发现其核苷酸序列相似性为96.65%~100.00%,编码蛋白氨基酸序列相似性为93.67%~100.00%。其中,分离物GZV009与印度尼

西亚的文心兰分离物TAIP Jakarta的*cp*基因核苷酸和编码蛋白氨基酸序列相似性最低,分别为96.65%和93.67%;GZV009与多个中国(广东、台湾)、印度和韩国的ORSV分离物*cp*基因核苷酸和编码蛋白氨基酸序列相似性均最高,分别为99.16%和98.10%(表4);且分离物ZC005和WY003的CP氨基酸序列完全一致。表明ORSV的*cp*基因序列在不同来源地、不同寄主分离物间均高度保守。

系统进化分析结果显示,43个ORSV分离物可聚类为2个类群I和II(图4)。本研究的6个ORSV分离物WY002、GZV009、GZV005、GZV006、WY003

和ZC005与来自中国、韩国、印度尼西亚和德国等国家的ORSV分离物被聚类在I类群,且I类群中ORSV分离物的寄主包括国兰、石斛兰和蝴蝶兰等多种植物,说明ORSV多样性种群的分化可能与寄主种类和地理隔离关系不大。

表4 本研究获得的ORSV分离物与GenBank中其它ORSV分离物的cp基因序列相似性比较
Table 4 Similarity comparison of cp gene sequences of ORSV isolates obtained in the present study and other isolates in the GenBank database

分离物 Isolate	登录号 Accession no.	寄主 Host	来源地 Isolated region	序列相似性/% Sequence similarity	
				核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid
GZV009	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	100.00	100.00
GZV005	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	99.16	98.10
GZV006	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	99.16	98.10
WY002	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	98.74	98.10
ZC005	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	99.16	98.10
WY003	—	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	99.16	98.10
TAIP Jakarta	AB693990.1	文心兰属 <i>Oncidium</i>	印度尼西亚 Indonesia	96.65	93.67
CHN-HNZZ03	KU873002.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国 China	98.74	94.30
Isolate 2	AF406771.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.32	96.20
XM2	MF034076.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国福建 Fujian, China	98.53	96.20
2243a	AJ429093.1	—	德国 Germany	98.95	96.84
ORSV	AF405727.1	树兰属 <i>Epidendrum</i>	韩国 South Korea	96.65	96.84
Gunung Sindur	AB693988.1	石斛兰属 <i>Dendrobium</i>	印度尼西亚 Indonesia	98.95	96.84
GZ1	KF836063.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广州 Guangzhou, China	98.53	97.47
GZ7	KF836081.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国广州 Guangzhou, China	98.53	97.47
KO-31	AJ606107.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	韩国 South Korea	98.53	97.47
Le 98-745	AJ429092.1	—	德国 Germany	98.74	97.47
O_PHALAEN MOGI CR	KX960755.1	—	巴西 Brazil	98.74	97.47
O-LZ22	KP137380.1	虾脊兰属 <i>Calanthe</i>	中国西藏 Tibet, China	98.53	97.47
ORSV 2	AF406778.1	万代兰 <i>Aranda</i>	新加坡 Singapore	97.90	97.47
ORSV	AF406775.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国台湾 Taiwan, China	98.95	97.47
Sikkim	FJ372909.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	印度 India	98.95	97.47
CK1	AB541474.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.95	97.47
Cy-1	S83257.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	日本 Japan	98.74	97.47
853	AJ429094.1	—	德国 Germany	98.95	97.47
ORSV	DQ139262.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国台湾 Taiwan, China	99.16	98.10
FS12	KF836075.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国佛山 Foshan, China	99.16	98.10
gd	KF836084.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	中国广东 Guangdong, China	99.16	98.10
Guizhou CP01	KF225471.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国贵州 Guizhou, China	98.95	98.10
GZ4	KF836078.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国广州 Guangzhou, China	99.16	98.10
GZ5	KF836079.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国广州 Guangzhou, China	98.95	98.10
ONK17	AB541521.1	文心兰属 <i>Oncidium</i>	韩国 South Korea	98.53	98.10
ORSV:CP	MG821323.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	印度 India	99.16	98.10
China	AF455274.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	中国 China	99.16	98.10
ORSV	AF455273.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	韩国 South Korea	99.16	98.10
NHRIK1	EU683879.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	99.16	98.10
SW8	KF855954.1	—	澳大利亚 Australia	98.74	98.10
Taiwan	DQ139262.1	兰科 Orchidaceae	中国台湾 Taiwan, China	99.16	98.10
Singapore-1	U34586.1	—	新加坡 Singapore	98.95	98.10
NIHHSK2	HQ644131.1	蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	韩国 South Korea	98.53	98.10
ORSV	E04305.1	文心兰属 <i>Oncidium</i>	中国台湾 Taiwan, China	98.95	98.10
Fujian	EF632298.1	—	中国福建 Fujian, China	98.95	98.10
CYK3	AB541489.1	蕙兰属 <i>Cymbidium</i>	韩国 South Korea	98.32	97.47

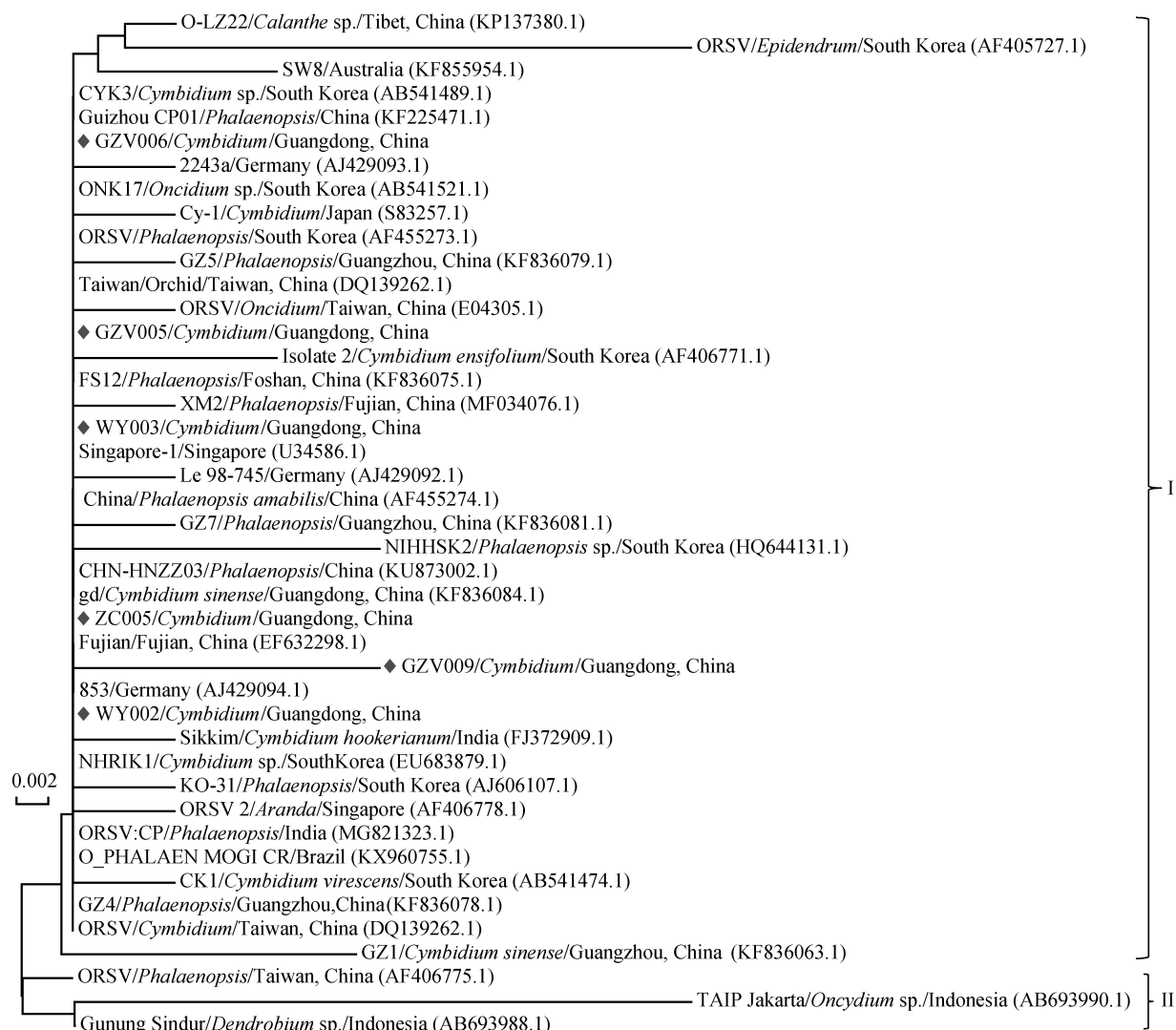


图4 基于 CP 氨基酸序列以邻接法构建 ORSV 各分离物的系统进化树

Fig. 4 The neighbor-joining phylogenetic tree of ORSV isolates structured based on CP amino acid sequences

图中内容表述形式为分离物/寄主/来源(登录号)。菱形标记分离物为本研究测定序列,未显示低于70%支持率的数值。The description is represented as the isolate/host/origin (accession number). The diamond indicates the sequence obtained in this study, and bootstrap values below 70% are not shown.

3 讨论

自20世纪90年代以来,国内外学者研究发现 CymMV 和 ORSV 是最主要的兰花病毒病病原,这2种病毒常复合侵染兰花(Jensen, 1970; 周国辉等, 2004; 曾燕君等, 2009)。郑平等(2001)对广东省兰花病毒病的检测结果表明,不同国兰栽培种复合感染 CymMV 和 ORSV 的比率为4.1%~10.8%;而周国辉等(2004)从采自广东省佛山市顺德区的153份国兰病样中仅检测到2份样品为 CymMV 和 ORSV 复合感染;柳爱春等(2009)对浙江省兰花病毒病的检测结果显示,卡特兰、蝴蝶兰复合感染 CymMV 和 ORSV 的比率高达66.7%和56.7%,而墨兰、建兰等

国兰的复合感染率较低,为2.2%~11.8%。本研究发现广东省国兰样品中 CymMV 和 ORSV 的复合检出率为20.75%,显著高于先前报道的复合感染率,说明广东省国兰复合感染 CymMV 和 ORSV 的比率有逐年增加的趋势。Ajjikuttira et al. (2005)研究结果表明, CymMV 的运动蛋白能与 ORSV 的 CP 交互,进而协同促进病毒在植物体内的移动,加重病毒对兰花的危害。兰花病毒病的病因复杂,其引起的枯斑、坏死和畸形等症状,常与炭疽病、叶斑病等细菌和真菌性病害的症状相混淆,或因隐症或症状不明显而被忽视。因此,需加强对 CymMV 和 ORSV 在不同兰花品种、不同生长时期的症状识别、检测手段和防控技术的研究和推广,为广东省兰花产业发展

提供有效的生产指导。

兰科植物作为被子植物中最大的科(张殷波等, 2015), 可被近 30 种植物病毒侵染, 包括杆状病毒属 *Rhabdovirus*、烟草花叶病毒属 *Tobamovirus*、马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 和番茄斑萎病毒属 *Tospoviruses* 等(Wong, 2000)。但国内对兰花病毒病的调查和检测侧重于 CymMV 和 ORSV, 且近 10 年来对广东省兰花病毒病的调查和检测几乎未见报道。本研究同时采用 RT-PCR 及 DAS-ELISA 技术对广东省国兰主产区感染病毒病的国兰样品进行检测, 发现其主要病原仍是 CymMV 和 ORSV, 未发现 CMV、CaCV 和 BaRMV 等其它病毒种类。但在具有花叶、坏死等疑似病毒病症状的样品中, 有 16.98% 的样品如 GZV-4、GZV-16、GZV017、ZC-16 等未检测出病毒。近期, 沈阳等(2019)从广东省佛山市顺德区的蝴蝶兰和文心兰上首次检出 CaCV, 且发病率高达 10%。CaCV 在叶片上常造成斑驳、花叶、坏死或斑点, 影响兰花的观赏价值。因此, 本研究中有症状但未检测到病毒的样品, 可能含有 CymMV、ORSV、CMV、CaCV 和 BaRMV 之外的新兰花病毒种类, 今后需要借助高通量转录组测序等技术进一步进行检测。目前, 生物防治和化学防治对植物病毒病仍无显著效果, 并且病毒会借助蚜虫、蓟马等传毒媒介传播(沈阳等, 2019)。对兰花病毒病的防控要做到早发现、早清除, 才能减少病毒病的扩展和暴发。因此, 需要综合运用多种检测手段对兰花病毒病进行全方位的动态检测, 进而对兰花生产提供切实可行的指导。

本研究结果显示, CymMV 和 ORSV 的 *cp* 基因核苷酸序列及编码蛋白氨基酸序列在来自不同地区 and 不同寄主的分离物间高度保守, 两者 CP 氨基酸序列相似性分别大于 97.31% 和 93.67%。与已报道的 CymMV 各分离物相比, 广东分离物的 CP 氨基酸序列同源性可达 96.2% 以上(周国辉等, 2004), 贵州长瓣兜兰分离物的 *cp* 基因编码蛋白氨基酸序列同源性均达 95% 以上(李欲轲等, 2014), 与本研究结果一致。国内对 ORSV 不同分离物 *cp* 基因的报道较少, 本研究对 6 个 ORSV 分离物 *cp* 基因序列进行了比对分析, 发现来自中国(广东、台湾)、印度、台湾和韩国的多个 ORSV 分离物亲缘关系最近, 核苷酸和编码蛋白氨基酸序列相似性均最高, 分别为 99.16% 和 98.10%。这将为进一步深入解析 ORSV 的遗传进化和致病机理提供重要的参考信息。CymMV 和 ORSV 的 CP 作为其唯一的结构蛋白, 可通过识别植

物细胞表面的受体蛋白, 实现其与寄主的亲和互作, 进而实现对植物的系统侵染(Maule et al., 2002)。CymMV 和 ORSV 的 *cp* 基因序列均具有较高的同源性, 说明不同的病毒分离物可能具有相似的致病性。同时, CymMV 和 ORSV 的 CP 单(多)克隆抗体制备, 以及基于 CP-RNAi 转基因载体的构建, 均需参考 *cp* 基因序列相似性, 本研究结果可为后续 CymMV 和 ORSV 检测抗体的制备及培育抗病毒病兰花品种提供一定的参考依据。

参 考 文 献 (References)

- AJIKUTTIRA P, LOH CS, WONG M. 2005. Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of *Cymbidium mosaic virus* RNA by *Odontoglossum ringspot virus* coat protein. *Journal of General Virology*, 86(5): 1543–1553
- HU JS, FERREIRA S, WANG M, XU MQ. 1993. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease*, 77(5): 464–468
- JENSEN DD. 1952. Virus diseases of orchids: transmission of the virus and observation of leaf and other symptoms reveal rare diseases in California. *California Agriculture*, 6(2): 7, 15–16
- JENSEN DD. 1970. Virus diseases of orchids in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76(3): 135–139
- KHENTRY Y, PARADORNWAT A, TANTIWIWAT S, PHANSIRI S, THAVEECHAI N. 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. *Crop Protection*, 25(9): 926–932
- KOH KW, LU HC, CHAN MT. 2014. Virus resistance in orchids. *Plant Science*, 228: 26–38
- LI YK, HONG K, ZHANG YB, YI Y, WAN QJ. 2014. Molecular identification of *Cymbidium mosaic virus* isolated from *Paphiopedilum dianthum* in Guizhou (China). *Plant Quarantine*, 28(5): 67–70 (in Chinese) [李欲轲, 洪鲲, 张宇斌, 乙引, 万晴姣. 2014. 建兰花叶病毒贵州分离物的分子鉴定. *植物检疫*, 28(5): 67–70]
- LIU AC, LIU C, ZHAO Y, XU XD. 2009. Detection of two orchid viruses using ELISA. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 21(2): 91–95 (in Chinese) [柳爱春, 刘超, 赵芸, 徐晓丹. 2009. 利用 ELISA 检测两种兰花病毒的研究. *浙江农业学报*, 21(2): 91–95]
- LIU ZX, PAN JS, ZHENG XQ. 1994. Identification and serological detection of *Odontoglossum ringspot virus* infecting orchids in Hainan. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 15(S1): 41–48 (in Chinese) [刘志昕, 潘俊松, 郑学勤. 1994. 侵染兰花的齿兰环斑病毒的分离、鉴定及检测研究. *热带作物学报*, 15(S1): 41–48]
- MAULE A, LEH V, LEDERER C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4): 279–284
- PAN JS, LIU ZX, ZHENG XQ. 1997. Identification and serological de-

- tection of Cymbidium mosaic virus infecting orchids in Hainan. Chinese Journal of Tropical Crops, 18(1): 63–70 (in Chinese) [潘俊松, 刘志昕, 郑学勤. 1997. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究. 热带作物学报, 18(1): 63–70]
- SHEN Y, HONG X, LÜ WG, ZHONG HW, DU YH, ZHANG QL, LI YF. 2019. Molecular identification of *Capiscum chlorosis virus* infected two species of orchids in Shunde, Guangdong Province. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 47(4): 125–127, 147 (in Chinese) [沈阳, 洪旭, 吕文刚, 钟海伟, 杜奕华, 张群玲, 李云峰. 2019. 侵染广东顺德2种兰花的辣椒褪绿病毒分子鉴定. 安徽农业科学, 47(4): 125–127, 147]
- TAN JX, ZHOU HP, MO J, ZHU JG, WU ZP, PENG Z. 2017. Visual DNA microarrays for detection of five orchid virus. Acta Phytopathologica Sinica, 47(5): 654–660 (in Chinese) [谭建锡, 周慧平, 莫瑾, 朱金国, 吴志鹏, 彭梓. 2017. 兰花5种病毒可视化基因芯片检测方法建立. 植物病理学报, 47(5): 654–660]
- TU XY, DONG XY, GUO CM, HE JP, BAO EP. 2017. Detection of three kinds of viruses of CymMV, ORSV and CMV in *Phalaenopsis* with multiple RT-PCR. Jiangsu Agricultural Sciences, 45(5): 91–93 (in Chinese) [涂小云, 董小艳, 郭春梅, 何俊平, 鲍恩亚. 2017. 多重RT-PCR检测蝴蝶兰3种病毒CymMV、ORSV和CMV. 江苏农业科学, 45(5): 91–93]
- WONG SM. 2000. Recent advances in plant virus detection. Acta Horticulturae, 568: 113–116
- XIAO HG, ZHENG GB. 1996. Studies on the identification and detection of orchid viruses in Guangdong Province. Journal of South China Agricultural University, 17(1): 21–24 (in Chinese) [肖火根, 郑冠标. 1996. 广东兰花病毒病的鉴定和检测研究. 华南农业大学学报, 17(1): 21–24]
- ZENG YJ, MO R, LIU ZX, WANG JH. 2009. Development of double RT-PCR protocol for detection of two viruses in orchid. Acta Agriculturae Jiangxi, 21(7): 12–14 (in Chinese) [曾燕君, 莫饶, 刘志昕, 王健华. 2009. 兰花两种主要病毒双重RT-PCR检测方法的建立. 江西农业学报, 21(7): 12–14]
- ZHANG YB, DU HD, JIN XH, MA KP. 2015. Species diversity and geographic distribution of wild Orchidaceae in China. Chinese Science Bulletin, 60(2): 179–188 (in Chinese) [张殷波, 杜昊东, 金效华, 马克平. 2015. 中国野生兰科植物物种多样性与地理分布. 科学通报, 60(2): 179–188]
- ZHENG P, LIU RW, XU MQ, ZHAO GL, WANG T, LIU Q. 2001. Comprehensive survey of two domestic virus diseases of *Cymbidium*. Guangdong Agricultural Sciences, (6): 37–40 (in Chinese) [郑平, 刘荣维, 徐明全, 赵贵林, 王韬, 刘擎. 2001. 国内两种主要兰花病毒病的综合普查研究. 广东农业科学, (6): 37–40]
- ZHOU GH, CHEN XQ, LI MH, ZHOU JL, TANG TH, FENG SX, GUO LJ, ZHANG W. 2004. Identification and detection of two major viruses infecting orchids by molecular technique. Virologica Sinica, 19(2): 149–152 (in Chinese) [周国辉, 陈晓琴, 李梅辉, 周洁浪, 唐添华, 冯盛祥, 郭丽晶, 张旺. 2004. 广东地区两种兰花病毒病害的分子鉴定及检测. 中国病毒学, 19(2): 149–152]

(责任编辑:李美娟)