

葡萄 A 病毒的 IC-RT-PCR 检测研究

魏梅生, 马洁, 李桂芬

(中国检验检疫科学研究院 植物检疫研究所, 北京 100029)

摘要:葡萄 A 病毒是葡萄皱木综合症的病原之一,通常与其它病毒混合发生,造成葡萄产量的损失。为有效检测葡萄 A 病毒,该研究建立了免疫捕获-反转录-聚合酶链式反应检测方法(IC-RT-PCR),将免疫学和核酸扩增技术结合起来使用。结果表明:IC-RT-PCR 方法检测的特异性较强,检测葡萄 A 病毒 2 个株系的结果为阳性,检测葡萄扇叶病毒、南芥菜花叶病毒、烟草环斑病毒结果为阴性。该方法检测提纯葡萄 A 病毒的灵敏度为 10 ng/mL,检测葡萄 A 病毒感染的 *Nicotiana benthamiana* 叶片可稀释到 10^{-6} 。

关键词:葡萄 A 病毒;IC-RT-PCR

中图分类号:S 436.631 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0099-05

葡萄 A 病毒(*Grapevine virus A*, GVA)属 β 线形病毒科(Betaflexiviridae)葡萄病毒属(*Vitivirus*)的模式种^[1]。病毒粒体呈弯曲线状,大小为 800 nm×12 nm。基因组为单分体正链 RNA,全序列已经测定含有 7 349 nt^[2]。现已明确 GVA 为葡萄皱木综合症(*Grapevine rugose wood complex*)中的 Kober 茎沟病(Kober stem grooving disease, KSG)的病原。GVA 通常引起葡萄砧木 Kober 5BB 的茎部产生纵向的茎沟,该病毒还可无症状感染一些葡萄的品种和砧木。GVA 可造成酿酒葡萄 5%~22% 的产量损失,GVA 和葡萄卷叶病毒混合感染可引起葡萄叶片衰退、光合作用下降,甚至引起整个植株的死亡^[3]。

GVA 在欧洲、地中海盆地、中东、南非、中国、澳大利亚、北美洲和拉丁美洲均有分布。嫁接是 GVA 在葡萄间传播的主要途径。GVA 还可由拟长尾粉蚧(*Pseudococcus longispinus*)、*P. affinis*、无花果粉蚧(*Planococcus ficus*)、橘粉蚧(*P. citri*)和 *Neopulvinaria innumerabilis* 传播,加剧了病毒的传播和危害。为减少该病毒对葡萄生产的影响,各国主要通过对该病毒的检测,筛选出健康的葡萄苗木用于生产,来控制其危害。

目前对该病毒的检测主要有传统的生物学指示植物法、血清学和分子检测等方法^[4-11]。由于 GVA 常和其它病毒混合发生,且 GVA 在植株体内浓度较低,分布不均匀,给检测造成一定的困难。传统的嫁接葡萄指示植

物的生物学方法比较费时,ELISA 方法检测灵敏度不高,RT-PCR 检测方法会因植物体内多酚和多糖类等物质的存在,获得高质量的 RNA 较为困难,使检测结果受到干扰。为提高检测的效率,该研究将免疫捕获和 RT-PCR 检测结合起来使用,以期建立简便易行的免疫捕获-反转录-聚合酶链式反应检测方法(Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction, IC-RT-PCR)。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与设备 GVA 兔多克隆抗体购自瑞士 Bioreba 公司。M-MLV 反转录酶、dNTP、RNasin 为 Promega 公司产品。Ex Taq 酶、DL 2 000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品。AB Applied Biosystems Veriti 梯度 PCR 仪、Beckman Coulter Avanti J-26XPI 高速离心机、Beckman Coulter Optima L-100XP 超速离心机、JEM-1400 透射电子显微镜、NanoDrop ND-1000 分光光度计。

1.1.2 病毒毒原 GVA 为美国 ATCC-PV-580(SA646)、ATCC-PV-631(SA36)株系,用 0.05 mol/L pH 7.0 的 PB (含 1 mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠,5 mmol/L 的二乙基二硫代氨基甲酸钠)接种缓冲液,加少许硅藻土研磨后,接种健康 *Nicotiana benthamiana* 叶片,置隔离空调温室中观察症状表现。葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)DIL 分离物引自澳大利亚,保存在莧色藜(*Chenopodium amaranticolor*)上;南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)ATCC-PV-192 分离物引自美国,保存在昆诺阿藜(*C. quinoa*)上;烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)引自英国,保存在白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv. White Burley)上。

第一作者简介:魏梅生(1965-),男,安徽巢湖人,硕士,研究员,现主要从事植物病毒病害的检疫检测等研究工作。E-mail: xsms2013@163.com。

基金项目:国家质量监督检验检疫总局课题资助项目(2012IK302)。

收稿日期:2014-09-26

1.2 试验方法

1.2.1 病毒的提纯 将 GVA-PV631 接种在 *Nicotiana benthamiana* 上,采收病叶 240 g,按 1 g 病叶加入 3 mL 的 0.05 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 0.2% 的巯基乙醇,0.01 mol/L $MgCl_2$),在捣碎机中捣碎,双层纱布过滤,滤液在 Beckman Avanti J-26 XPI 离心机上用 JLA16.25 转头,5 000 r/min($3\ 752\times g$),离心 10 min,收集上清。在上清中加入 2% 的 Triton X-100,8% 的 PEG (MW,6 000)和 1% 的 NaCl,搅拌 3.5 h 溶解,并 4℃ 静置 1 h。用 JLA16.25 转头,10 000 r/min($15\ 008\times g$),离心 10 min,收集沉淀并用 0.05 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 悬浮,4℃ 搅拌 1 h,用 JLA16.25 转头,8 000 r/min ($9\ 605\times g$),离心 15 min,收集上清。在 Beckman Coulter Optima L-100XP 超速离心机用 SW41Ti 转头,33 000 r/min ($186\ 733\times g$)超速离心 2 h。沉淀用 0.05 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 悬浮,4℃ 搅拌 1.5 h。在 Beckman Avanti J-26 XPI 离心机上用 JA30.50 转头,10 000 r/min($12\ 096\times g$),离心 15 min,收集上清约 30 mL。上清用 3 支 12.5 mL 的离心管(含 2 mL,20% 的蔗糖垫),在 Beckman Coulter Optima L-100XP 超速离心机用 SW41Ti 转头,34 000 r/min($198\ 221\times g$)超速离心 2 h。沉淀用 2 mL 0.05 mol/L pH 7.8 的 Tris-HCl,4℃ 搅拌 1 h。用小型台式离心机,6 000 r/min,离心 10 min,上清即为提纯的病毒。用紫外分光光度计测吸收值,确定病毒的浓度。提纯 GVA 的浓度(mg/mL) = $(1.45 \times OD_{260} - 0.74 \times OD_{280})^{[12]}$ 。

1.2.2 双抗体夹心酶联(DAS-ELISA)检测 采用瑞士 Bioreba AG 的 DAS-ELISA 检测试剂盒,具体操作步骤按试剂盒的说明书进行。

1.2.3 IC-RT-PCR 检测的制备样品 取 0.1 g 的病叶,按 1:10(重量:体积)的比例加入样品提取缓冲液,研磨后经 5 000 r/min 离心 5 min,上清液用于检测。研磨 *Nicotiana benthamiana* 叶片时用 pH 7.4 的 PBS 抽提缓冲液,研磨葡萄叶片时用 pH 8.2 的 Tris-HCl 抽提缓冲液。

1.2.4 IC-RT-PCR 检测的包被抗体 用 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液将 GVA 的抗体按 1:200 稀释成工作浓度,将 50 μ L 的抗体溶液加到 0.2 mL 的 PCR 管(Axygen)中,37℃ 孵育 2 h。倒掉管中的抗体溶液,PCR 管用 PBST 洗涤 3 次。

1.2.5 IC-RT-PCR 检测的捕获抗原 取 50 μ L 样品上清液加入到已包被抗体的 PCR 管中,4℃ 孵育过夜。倒掉样品上清液,PCR 管用 PBST 洗涤 3 次,灭菌的蒸馏水洗涤 3 次。

1.2.6 RT-PCR 检测 引物设计:引物参照文献[13],

正向引物 GVA-f:5'-GAGGTAGATATAGTAGGACCTA-3';反向引物 GVA-r:5'-TCGAACATAACCTGTGGCTC-3'。使用该对引物预期扩增出的片段大小为 272 bp。反转录体系:在捕获抗原后的 PCR 管中进行反转录,采用 20 μ L 反转录体系(DEPC 处理过的水 11 μ L,5× Buffer 缓冲液 4 μ L,20 μ mol/L 的反向引物 2 μ L,10 mmol/L 的 dNTP 1 μ L,40 U/ μ L 的 RNasin 1 μ L,200 U/ μ L 的 M-MLV 反转录酶 1 μ L),先加入 DEPC 处理过的水、dNTP、反向引物,70℃ 孵育 5 min,冰浴 2 min,再加入其它试剂,42℃ 水浴 1 h 合成 cDNA 链。PCR 反应体系:取 1 μ L 的反转录产物,加 10× PCR Buffer(含有 Mg^{2+}) 2.5 μ L,DEPC 处理过的水 19.2 μ L,20 μ mol/L 的正向引物 0.5 μ L,20 μ mol/L 的反向引物 0.5 μ L,10 mmol/L 的 dNTP 1 μ L,5 U/ μ L 的 *Ex Taq* 酶 0.3 μ L,总体积为 25 μ L,混匀后进行 PCR 反应。PCR 程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min 后保存于 4℃ 环境下。取 5 μ L PCR 产物在 1% 的琼脂糖上电泳,凝胶成像仪上拍照。

1.2.7 IC-RT-PCR 检测灵敏度 用系列稀释的 GVA 提纯病毒(10 μ g/mL,1 μ g/mL,100 ng/mL,10 ng/mL,1 ng/mL,0.1 ng/mL,0.01 ng/mL)和病汁液(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})。经 IC-RT-PCR 检测,观察目标条带的出现情况,来确定检测的灵敏度。

1.2.8 IC-RT-PCR 检测特异性 用 GVA 的 2 个株系(PV-580 和 PV-631)、GFLV、ArMV、TRSV、健康对照等进行特异性测试。用 IC-RT-PCR 法检测,观察目标条带有无,来确定检测方法的特异性。

2 结果与分析

2.1 症状

GVA(PV-580)接种 *Nicotiana benthamiana* 10~14 d 后,叶片的细脉上出现系统明脉,后期叶片畸形、植株矮缩。GVA(PV-631)接种 *Nicotiana benthamiana* 10~14 d 后,叶片的叶脉间出现明显的褪绿斑块,后期叶片畸形、植株矮缩(图 1)。

2.2 酶联检测

将 PV-580 和 PV-631 株系接种 *Nicotiana benthamiana* 出现典型症状的病叶,用 Bioreba 公司的 DAS-ELISA 试剂盒检测,结果二者均为阳性,而健康 *Nicotiana benthamiana* 叶片的检测结果为阴性。酶联确认后的 GVA 毒原用于此后病毒的提纯和 IC-RT-PCR 检测。

2.3 病毒的紫外吸收和粒体形态

提纯的 GVA 经紫外测定,呈典型的核蛋白吸收曲线, $OD_{260}=42.435$, $OD_{280}=22.410$ (图 2), $OD_{260}/OD_{280}=1.89$, $OD_{260}/OD_{230}=1.32$,病毒浓度为 1.0926 mg/mL,240 g 病叶共获得 1.8 mL 的提纯病毒,病毒产量约为

0.82 mg/100g 病叶。提纯的病毒用 2% 醋酸双氧铀负染后在透射电子显微镜下可见到长度约 800 nm 的线状病毒粒体(图 3)。



注:左为 PV-580 引起叶片明脉症状;右为 PV-631 引起叶片脉间褪绿症状。

Note: Left; leaves inoculated with PV-580 show vein clearing; right; leaves inoculated with PV-630 show interveinal chlorosis.

图 1 GVA 在 *Nicotiana benthamiana* 上的症状

Fig. 1 Symptoms of GVA on *Nicotiana benthamiana* leaves

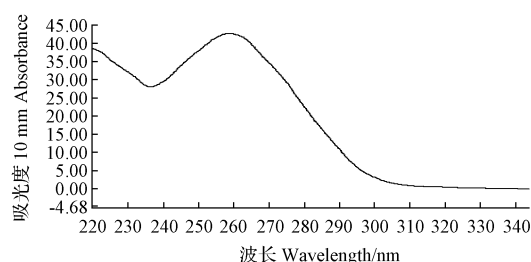


图 2 提纯 GVA 的紫外吸收曲线

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of purified GVA

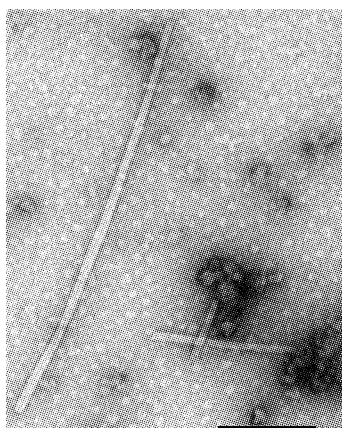


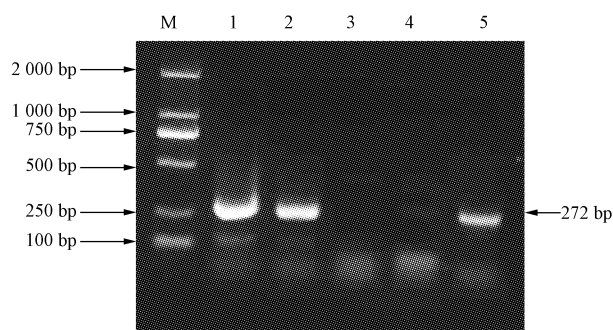
图 3 提纯的 GVA (ATCC-PV-631 株系)
线状病毒粒体 (标尺=200 nm)

Fig. 3 Purified virus particles of GVA
(ATCC-PV-631) (Bar=200 nm)

2.4 IC-RT-PCR 检测结果

采用 IC-RT-PCR 法检测 GVA(ATCC-PV-631) 的 *Nicotiana benthamiana* 病叶 (10^{-1}) 和提纯病毒

($10 \mu\text{g/mL}$) 扩增出预期的 272 bp 目标产物,结果和普通 RT-PCR 的扩增产物一致。健康对照和水空白对照未扩增出相应大小的片段(图 4)。



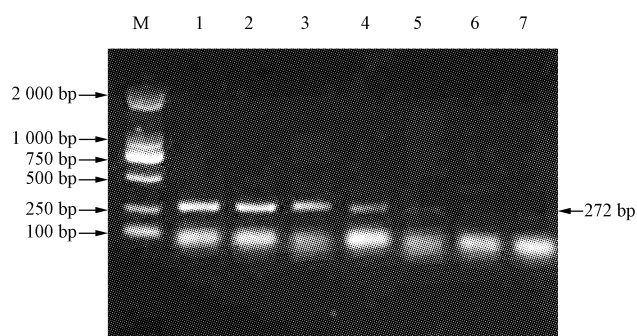
注:M 为 DL 2 000 Marker,下同;1~4 为 IC-RT-PCR(*Nicotiana benthamiana* 病叶、提纯的病毒、健康 *Nicotiana benthamiana* 对照、水对照);5 为普通的 RT-PCR(*Nicotiana benthamiana* 病叶)。

Note:M;DL 2 000 Marker, the same below;1-4;IC-RT-PCR(GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves, purified virus, healthy *Nicotiana benthamiana* leaves control, water control);5;Conventional RT-PCR(GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves).

图 4 GVA-PV-631 的 IC-RT-PCR 和普通的 RT-PCR 检测

Fig. 4 Detection of GVA -PV-631 by IC-RT-PCR and RT-PCR

2.4.1 IC-RT-PCR 检测的灵敏度 检测提纯的 GVA 病毒(PV-631),结果是浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 100 ng/mL 、 10 ng/mL 的 GVA 均扩增出预期的 272 bp 片段,而浓度为 1 、 0.1 、 0.01 ng/mL 的 GVA 则未扩增出相应的目标片段(图 5)。检测 *Nicotiana benthamiana* 病叶结果是,在 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度时都能扩增出预期的 272 bp 片段,在 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释度时未能扩增出预期的片段(图 6)。



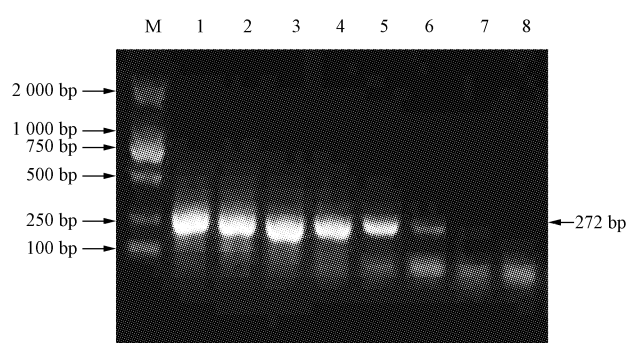
注:1~7 为提纯病毒($10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 100 ng/mL 、 10 ng/mL 、 1 ng/mL 、 0.1 ng/mL 、 0.01 ng/mL)。

Note:1-7;Purified virus($10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 100 ng/mL 、 10 ng/mL 、 1 ng/mL 、 0.1 ng/mL 、 0.01 ng/mL)。

图 5 IC-RT-PCR 检测提纯病毒的灵敏度

Fig. 5 Detection of purified GVA by IC-RT-PCR

2.4.2 IC-RT-PCR 检测的特异性 检测 GVA-PV-631 株系、GVA-PV-580 株系可有效扩增出 272 bp 的目标片



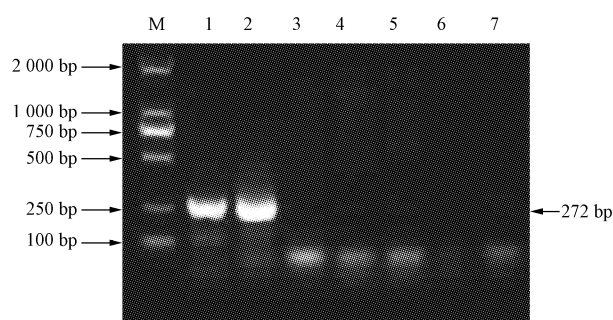
注:1~8 为病汁液(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})。

Note:1-8: GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves sap dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}).

图 6 IC-RT-PCR 检测病汁液的灵敏度

Fig. 6 Detection of GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves sap by IC-RT-PCR

段,而 GFLV、ArMV、TRSV、*Nicotiana benthamiana* 健康对照、水空白对照则扩增不出目标片段(图 7)。



注:1. GVA-PV-631;2. GVA-PV-580;3. GFLV;4. ArMV;5. TRSV;6. 健康 *Nicotiana benthamiana*;7. 水对照。

Note:1. GVA-PV-631;2. GVA-PV-580;3. GFLV;4. ArMV;5. TRSV;6. Healthy *Nicotiana benthamiana* leaves control;7. Water control.

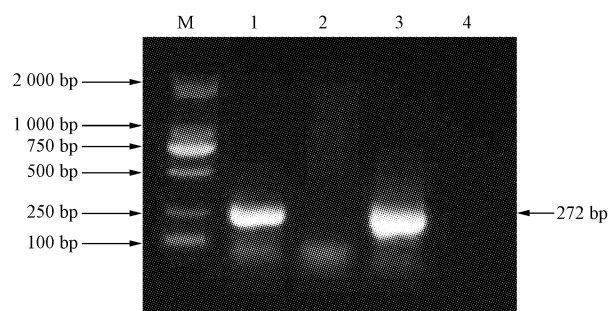
图 7 IC-RT-PCR 检测的特异性

Fig. 7 Specific test of GVA by IC-RT-PCR

2.4.3 IC-RT-PCR 检测健葡萄稀释的样品 将 GVA (PV-631)感染的 *Nicotiana benthamiana* 病叶用健康的葡萄(赤霞珠)叶汁液稀释成 10^{-2} 后,IC-RT-PCR 可有效扩增出和 272 bp 的目标片段,和 *Nicotiana benthamiana* 病叶直接检测的结果一致,健康葡萄叶和健康 *Nicotiana benthamiana* 叶片则扩增不出相应的目标片段(图 8)。

3 讨论与结论

GVA 的自然寄主是葡萄属植物,摩擦接种仅能感染少数草本植物,*Nicotiana benthamiana* 是繁殖 GVA 的重要草本植物,病毒提纯结果显示 100 g 的 *Nicotiana benthamiana* 病叶仅能得到 0.82 mg 的提纯病毒,说明 GVA 在植株体内的浓度较低。该试验采用 GVA 的特异性抗体包被 PCR 管,用于捕获靶标病毒,洗涤后可除去植物体内钝化物质对 RT-PCR 方法的不利影响,充分利用 PCR 方法的优势进一步放大检测的信号,以提高检



注:1. GVA-PV-631+赤霞珠葡萄健叶;2. 赤霞珠葡萄健叶;3. *Nicotiana benthamiana* 病叶;4. *Nicotiana benthamiana* 健叶。

Note:1. GVA-PV-631+Healthy Cabernet sauvignon leaves;2. Healthy Cabernet sauvignon leaves;3. GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves;4. Healthy *Nicotiana benthamiana* leaves.

图 8 IC-RT-PCR 检测健葡萄稀释的样品

Fig. 8 GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves diluted with healthy Cabernet sauvignon leaves sap

测的效果。

该研究所建立的 IC-RT-PCR 检测方法具有较高的检测灵敏度。检测提纯病毒的灵敏度可到 10 ng/mL,检测 GVA 感染的 *Nicotiana benthamiana* 病叶可稀释到 10^{-6} ,可用于对这种低浓度病毒的检测。此方法可特异性检测到 GVA-PV-631 和 GVA-PV-580 两个株系,而葡萄上的 GFLV、ArMV、TRSV 等病毒检测结果为阴性,方法的特异性较好。

IC-RT-PCR 和普通 RT-PCR 相比,具有特异性强,操作简便的优点。IC-RT-PCR 采用特异性抗体可有效富集靶标病毒,消除了植物体内干扰物质对检测结果的影响,此外 IC-RT-PCR 检测省去了普通 RT-PCR 检测方法中的核酸抽提过程,仅在反转录时在 70℃ 条件下孵育 5 min 即可直接用于此后的 RT-PCR 检测,缩短了检测时间,降低了检测成本,方法更简便、实用。

参考文献

- [1] Martelli G P, Minafra A, Saldarelli P. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses[J]. Arch Virol, 1997, 142: 1929-1932.
- [2] Minafra A, Saldarelli P, Martelli G P. *Grapevine virus A*: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the *Trichovirus* genus[J]. Arch Virol, 1997, 142(2): 417-423.
- [3] Martelli G P, Conti M, Minafra A. Grapevine virus A. Descriptions of plant viruses[DB/OL]. <http://www.dpvweb.net/dpv/>, 2001, No. 383.
- [4] Monette P L, James D. Detection of two strains of Grapevine virus A[J]. Plant Disease, 1990, 74: 898-900.
- [5] Gambino G, Bondaz J, Griboaud I. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine[J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 114: 397-404.
- [6] 刘晓, Boscia T D, Raimondi, 等. 四川葡萄病毒田间普查及血清学鉴定[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 52-56.
- [7] 王建辉, 刘晓, 席德慧, 等. 葡萄 A 病毒四川分离物外壳蛋白基因克隆与原核表达[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 967-972.
- [8] 任芳, 范旭东, 董雅凤, 等. 葡萄 A 病毒外壳蛋白基因克隆及分子变异分析[J]. 分子植物育种, 2012, 10(5): 568-574.

蓝莓茎段离体快繁研究

赵兴宇¹, 李丽丽^{2,3}, 杨洪一¹

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081;
3. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以大兴安岭地区野生蓝莓苗木为试材,取当年生幼嫩茎段为外植体,探索建立蓝莓组培苗的快繁体系。结果表明:外植体消毒处理组合为 75%乙醇处理 10~15 s, 0.1%升汞处理 10 min。培养基为 WPM 培养基,愈伤组织诱导及不定芽增殖时期应用的激素组合 ZT 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L。利用 IBA 蘸根法诱导不定根,激素浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$,芽诱导率超过 80%,生根率超过 70%。

关键词:蓝莓;外植体;组织培养;不定根

中图分类号:S 663.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0103-03

蓝莓属杜鹃花科越橘属(*Vaccinium*),原产北美,在我国主要集中分布于东北及西南地区。蓝莓苗木的繁

殖方式有扦插、实生、分株等。目前,我国的蓝莓苗木在生产上通常以扦插繁殖方法为主,其它方法如种子育苗,根状茎扦插、分株等也有应用。近年来,植物组织培养方法以其不受生长季节限制、培养周期短、可短时间大量繁殖等优点逐渐被应用到蓝莓繁殖的领域。与草莓、马铃薯等作物相比,蓝莓组织培养尚处于起步阶段,主要问题在于组培过程中,蓝莓的增殖过程较慢,且生根较困难,根质量较差,因而移栽至田间后成活率较低。该研究以野生蓝莓当年生幼嫩茎段为外植体,探索建立蓝莓

第一作者简介:赵兴宇(1989-),男,吉林人,硕士研究生,研究方向为微生物学。

责任作者:杨洪一(1978-),男,吉林九台人,博士,副教授,现主要从事微生物学等研究工作。E-mail: yhy1@sohu.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31200517;31300573);中国博士后科学基金资助项目(2011M500706;2012T50382)。

收稿日期:2014-10-11

[9] 王建辉,刘建军,陈克玲,等. 三种葡萄病毒的 RT-PCR 检测和系统进化分析[J]. 果树学报,2013,30(2):197-201.

[10] 廖富荣,叶志红,陈青,等. 应用 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 方法检测南瓜花叶病毒[J]. 植物检疫,2013,27(2):60-64.

[11] 杨翠云,曹洁,于翠,等. 烟草环斑病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测方法研究[J]. 上海农业学报,2007,23(1):83-87.

[12] 李勇. 葡萄病毒 A 多克隆抗体的制备及检测效果分析[D]. 武汉:华中农业大学,2009.

[13] Gambino G, Gribaudo I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control[J]. Phytopathology, 2006, 96: 1223-1229.

Study on Detection of *Grapevine virus A* by Immunocapture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)

WEI Mei-sheng, MA Jie, LI Gui-fen

(Institute of Plant Quarantine, China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029)

Abstract: *Grapevine virus A* (GVA) is one of pathogens causing grapevine rugose wood complex, which can be caused by many kinds of viruses simultaneously. In order to more effectively detecting this virus, an immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) was developed for detecting *Grapevine virus A* in this study. The results showed that 2 strains of GVA were detected using this method. There was no cross reaction with *Grapevine fanleaf virus*, *Arabidopsis mosaic virus* and *Tobacco ringspot virus*. The sensitivity of the assay was 10 ng/mL for detecting purified GVA. Extract from GVA infected *Nicotiana benthamiana* leaves was detected to a dilution of 10^{-6} .

Keywords: *Grapevine virus A*; IC-RT-PCR