

任春梅, 程兆榜, 杨 柳, 等. 江苏省葫芦科作物 6 种病毒的多重 RT-PCR 方法及应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 756-763.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.008

江苏省葫芦科作物 6 种病毒的多重 RT-PCR 方法及应用

任春梅, 程兆榜, 杨 柳, 缪 倩, 周益军

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 江苏省葫芦科作物上的病毒主要有小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)、西瓜花叶病毒(WMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)、烟草花叶病毒(TMV)和番木瓜环斑病毒(PRSV), 通常发生复合侵染。基于 GenBank 中这 6 种病毒的核苷酸序列保守区设计特异性引物, 在单重 RT-PCR 技术的基础上, 通过对影响 2 种多重 RT-PCR 扩增的 DNA 聚合酶浓度、dNTPs 及镁离子浓度、退火温度、延伸时间、循环次数等因素进行优化, 对检测灵敏度进行测定, 建立了 2 种 PCR 反应同时检测葫芦科作物上 6 种病毒的多重 RT-PCR 方法。结果显示: 2 种多重 RT-PCR 体系均能同时扩增出各自特异性片段, 测序分析结果表明序列同源性在 97% 以上; 优化的 2 种多重 RT-PCR 体系检测灵敏度为总 RNA 稀释 $10^2 \sim 10^3$ 倍, 应用于江苏省 210 份样品的检测结果与单重 RT-PCR 一致, 体现了检测的可靠性; 检测结果表明近年来江苏省葫芦科作物以种子传播的 ZYMV 和 CGMMV 侵染为主, 病毒的复合侵染率达 75.24%。

关键词: 葫芦科作物; 病毒; 多重 RT-PCR

中图分类号: S436.421.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)04-0756-08

Establishment and application of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of six viruses on Cucurbit crops in Jiangsu province

REN Chun-mei, CHENG Zhao-bang, YANG Liu, MIAO Qian, ZHOU Yi-jun

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Cucurbit crops are frequently co-infected by zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), watermelon mosaic virus (WMV), cucumber mosaic virus (CMV), cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), tobacco mosaic virus (TMV) and papaya ringspot virus (PRSV) in Jiangsu province. Based on the RT-PCR for the detection of single virus, the two multiplex RT-PCR (mRT-PCR) systems were established for simultaneous detection of the six viruses by using six sets of specific primers designed on the basis of conserved sequences of the viruses in GenBank. The main factors such as concentrations of DNA polymerase, Mg^{2+} and dNTPs, PCR conditions of annealing temperature, extension time and amplification cycles, sensitivity of the detection were examined and optimized. The results showed that expected fragments of the six viruses were amplified in the two mRT-PCR systems and the sequences shared above 97 percent similarities with those of

other relative viruses. The optimized mRT-PCR could detect diluted 100 to 1000 times. The results of the mRT-PCR were consistent with sRT-PCR on detecting 210 samples of cucurbit crops in Jiangsu province which reflects the reliability of the protocol. The results also revealed that in recent years the seed transmission viruses ZYMV and CGMMV were the dominant infectious viruses on cucurbit

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 国家公益性行业科研专项(201303028); 江苏省农业科技创新基金项目[CX(13)3023]

作者简介: 任春梅(1981-), 女, 江苏大丰人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物病毒研究。

通讯作者: 程兆榜, (E-mail) onlyone8501@126.com

crops in Jiangsu province, with the co-infection rate of 75.24%.

Key words: cucurbit crop; virus; multiplex RT-PCR

葫芦科作物是一种仅次于禾本科、豆科和茄科作物的世界性重要经济作物,主要分布于热带和亚热带^[1-2]。与大田作物相比,该类作物类型多,品种杂,单品种面积小。葫芦科作物病害中病毒病害的发生最为严重,国际病毒分类委员会(ICTV)发布的侵染葫芦科作物的病毒达 38 个确定种和 9 个暂定种^[3]。不仅病毒种类繁杂,株系众多,而且不同病毒同时侵害引起的复合侵染现象普遍,病害发生年度间变化大,给防控和检测都带来很大难度^[4]。

江苏省自种植结构调整发展高效农业以来,蔬菜种植业发展迅速,目前复种面积已达 $1.3 \times 10^5 \text{ hm}^2$ 以上(含西瓜甜瓜),生产中病毒病是其主要病害问题之一。江苏省葫芦科作物病毒病原种类主要有西瓜花叶病毒^[5](Watermelon mosaic virus, WMV)、小西葫芦黄花叶病毒^[6](Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、黄瓜花叶病毒^[7](Cucumber mosaic virus, CMV)和黄瓜绿斑驳病毒^[8](Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV),烟草花叶病毒^[9](Tobacco mosaic virus, TMV)和番木瓜环斑病毒^[10](Papaya ringspot virus, PRSV)偶有发生,在田间常发生复合感染现象。针对这一具体情况,开发简便、快捷、稳定、实用以及能够同时检测多个病毒的技术用于生产上病毒病害发生动态的监测,对于葫芦科作物病毒病防控至关重要。

多重 RT-PCR 检测技术最早由 Chamberian 等^[11]于 1988 年提出,现已广泛应用于生命科学各个领域,在植物病毒病的检测中也已成为一种重要的检测手段^[12-16]。与其他检测方法(生物学、血清学、电镜观察、单重 RT-PCR、核酸杂交等^[17])相比,多重 RT-PCR 检测技术具有诸多优点,它能在同一个 PCR 体系中同时扩增多个目的基因,省时,省力,效率高,特别是节省昂贵的实验试剂和珍贵的实验材料。由于葫芦科病毒病的病原多,感染情况复杂,针对单一病毒的检测方法已远远不能满足检测工作的需求,所以国内外已有一些此类病毒的多重 RT-PCR 检测报道。王威麟等^[18]针对西瓜上普遍发生的 ZYMV、WMV、TMV、SqMV 和 CMV 5 种病毒建立了一步 RT-PCR 检测方法;赵丽等^[19]建立了一种同时检测葫芦科作物 3 种主要病毒 ZYMV、WMV 和

CMV 的多重 RT-PCR 方法;Kwon 等^[20]用 2 个多重 PCR 系统检测侵染韩国葫芦科作物的 7 种病毒。根据前人的研究结果,本试验针对江苏省葫芦科作物病毒病发生的种类和特点,建立一种适用于江苏省葫芦科作物病毒病检测的多重 RT-PCR 方法,并对江苏省各地采集的样品进行检测应用,以期为江苏省葫芦科作物病毒病害的发生动态进行长期有效的监测,从而有针对性地采取防控措施。

1 材料与方法

1.1 毒源和试剂

WMV、ZYMV、CMV、CGMMV、TMV 和 PRSV 6 种病毒的分离物于 2012–2014 年从江苏省南京市、盐城市盐都区、徐州市、洪泽县、淮安市等地发病的甜瓜、西葫芦、西瓜、南瓜等上采集,通过 6 种病毒的血清学诊断试剂盒(Agdia 公司)找到 6 种病毒单独侵染的样品,并在西葫芦上接种繁殖,样品保存于 -70°C 冰箱中。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, Taq DNA 聚合酶、dNTP、BamH I、Sal I 购自大连宝生物公司,反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒、大肠杆菌(*E. coli* DH5 α)感受态细胞、pMD18-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 总 RNA 提取

在单重 RT-PCR 中,分别称取各病毒单独侵染叶片 0.1 g;在多重 RT-PCR 中,分别称取等量单独侵染 6 种病毒的叶片,WMV、ZYMV、CMV 和 CGMMV 4 种叶片充分混合(标记为 H4),TMV 和 PRSV 2 种叶片充分混合(标记为 H2),H4、H2 各取 0.1 g。单重和多重 RT-PCR 中,都以健康西葫芦叶片为阴性对照(标记为 CK),也取 0.1 g。叶片在冰浴条件下迅速彻底研磨,然后用 Trizol 试剂盒按产品说明书提取总 RNA。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 上登录的各病毒相对保守基因的序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计各病毒特异性引物。引物设计完成后,通过 NCBI 对其特异性进行鉴定,结果表明均具有良好的特异性(表 1)。引物由上海英俊生物技术公司合成。

表 1 多重 RT-PCR 扩增 6 种病毒的特异性引物

Table 1 Specific primers for multiple RT-PCR detection of 6 viruses

引物	序列 (5'→3')	扩增长度 (bp)	退火温度 (°C)
WMV-F	CCAGTGGCAAAGGTGATA	485	51.0
WMV-R	TGCTGCGTCTGAGAAATG		54.2
ZYMV-F	AGCTCCATCATAGCTGAGCAG	1 200	52.1
ZYMV-R	TAGCTTGCGCTTGCAAACGAC		55.2
CMV-F	CACTATTCCCGACTTTGAGACCC	389	55.0
CMV-R	CTCATAAGCGGCATACTCTAACAT		53.5
CGMMV-F	CCACGAGTTGTTTCCTAATGCTG	660	53.3
CGMMV-R	TTTGCTAGGCGTGATCGGATTGT		55.0
TMV-F	TGGATCCGCCGACCCAATAGAGTTA	410	55.5
TMV-R	GTCGAGGTCCAACTAAACCAGAAG		56.5
PRSV-F	ATGAGGCTGTGGATGCTGGTTTA	325	54.0
PRSV-R	GATTGAGTGGCACGAGTATTAGA		56.0

1.4 单重 RT-PCR

以 WMV、ZYMV、CMV、CGMMV、TMV 和 PRSV 单一病毒的 RNA 为模版, oligodT18 引物^[21] 反转录得到 cDNA 第一链, 反应程序参照 M-MLV 说明书, 15.0 μl 反应体系为: 3.0 μl RNA, 1.0 μl oligodT18 (10 $\mu\text{mol/L}$), 6.0 μl DEPC-ddH₂O, 65 °C 变性 5 min, 迅速置冰上 5 min; 再加入 2.5 μl 5 \times RT buffer, 0.5 μl dNTP (各 2.5 mmol/L), 0.5 μl RNase Inhibitor (40 U/ μl) 和 0.5 μl M-MLV 反转录酶 (200 U/ μl), 短暂离心后 DEPC-ddH₂O 补足至 15.0 μl , 42 °C 水浴 1 h, 70 °C 灭活 5 min, 置冰上待用。

25.00 μl PCR 标准反应体系: 15.75 μl ddH₂O, 2.50 μl 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ free), 1.50 μl MgCl₂ (25 mmol/L), 2.00 μl dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 1.00 μl 上游和下游引物混合物 (各 10 $\mu\text{mol/L}$), 0.25 μl r-Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μl) 和 2.00 μl cDNA 模板。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 53 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像系统进行观察分析。

1.5 多重 RT-PCR 及体系优化

多重 RT-PCR 分 4 重和 2 重 2 个反应。4 重和

2 重 RT 反应体系: 加入混合提取的 4 种和 2 种病毒的总 RNA (H4 和 H2) 各 3.0 μl , 同时将 1.0 μl oligodT18 的反转录引物加入同一反应管中, 其他条件与单重 RT 相同。多重 PCR 体系在上述 25.0 μl 单重 PCR 标准反应体系基础上, 4 重 PCR 的 4 对引物混合物为 4.00 μl [WMV 和 CMV 上下游引物各 0.60 μl , ZYMV 和 CGMMV 上下游引物各 0.40 μl (各 10 $\mu\text{mol/L}$)], 2 重 PCR 的 2 对引物混合物为 2.00 μl [TMV 和 PRSV 上下游引物各 0.5 μl (各 10 $\mu\text{mol/L}$)], PCR 反应程序参数同上。取 5 μl PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

在有效 mRT-PCR 条件下, 考察影响 mPCR 的主要因素, 对某一因素进行考察时, 其他因素不变。在试验过程中对 Taq DNA 聚合酶浓度分别设 0.02 U/ μl 、0.04 U/ μl 、0.06 U/ μl 、0.08 U/ μl 、0.10 U/ μl 和 0.12 U/ μl 6 个处理, Mg²⁺ 浓度分别设 1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、3.0 mmol/L、4.0 mmol/L、5.0 mmol/L 和 6.0 mmol/L 6 个处理, dNTPs 浓度分别设 0.10 mmol/L、0.25 mmol/L、0.40 mmol/L、0.55 mmol/L、0.70 mmol/L 和 0.85 mmol/L 6 个处理, 退火温度分别设 48 °C、51 °C、53 °C、56 °C、58 °C 和 60 °C, 延伸时间分别设 50 s、60 s、70 s、80 s、90 s 和 100 s, 循环次数设 20、25、30、35、40 和 45, 进行多重 RT-PCR 体系优化。

1.6 多重 RT-PCR 产物的克隆和测序

多重 RT-PCR 扩增 DNA 靶片段采用 Axygen 柱式胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收,回收 DNA 溶于 30 μ l 的溶解液中。回收产物与 pMD18-T 载体连接(参照 pMD18-T 试剂盒说明书)。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,碱裂解法提取质粒,经 PCR 及酶切鉴定筛选重组质粒。每个分离物挑选 2 个阳性克隆进行测序,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.7 多重 RT-PCR 的灵敏度测定

取混合样品 H4 和 H2 提取的病毒总 RNA 各 5 μ l,用 BioPhotometer plus 核酸蛋白检测仪测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,计算各自总 RNA 浓度。分别以 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 的倍数进行稀释,用建立的 4 重和 2 重 RT-PCR 方法进行检测,观察结果,分析 2 种多重 RT-PCR 方法检测的灵敏度。

1.8 多重 RT-PCR 的检测应用

应用建立的 2 种多重 RT-PCR 方法对 2014 年采自江苏省 13 个市县的 210 份葫芦科作物发病样品进行检测,并随机挑选 15 个样品用单重 RT-PCR 方法进行验证,分析江苏省葫芦科作物病毒病的种类及分布状况。

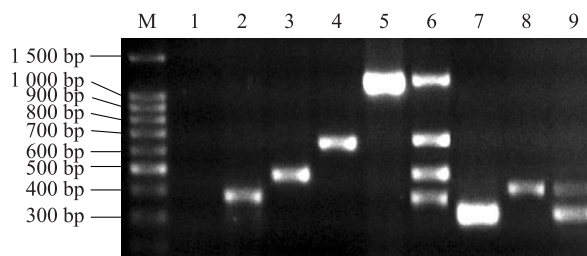
2 结果与分析

2.1 多重 RT-PCR 的特异性

用单重、4 重和 2 重 RT-PCR 法分别从 6 种病毒单独侵染、4 种病毒混合侵染(H4)、2 种病毒混合侵染(H2)的组织中扩增出单一、4 条或 2 条特异性目标条带,大小约为 390 bp、480 bp、670 bp、1 200 bp、330 bp 和 400 bp,扩增条带的大小与待检 6 种病毒基因预期条带大小基本一致;阴性对照没有扩增出任何条带,且均未出现非特异性条带(图 1)。结果表明:4 重和 2 重 RT-PCR 具有较高的特异性,在 4 重 RT-PCR 中检测到 CMV、WMV、CGMMV 和 ZYMV,在 2 重 RT-PCR 中检测到 TMV 和 PRSV,且两步反应中的各条带大小间有差异,可以明显地进行区分。

2.2 多重 RT-PCR 主要影响因素的优化

2.2.1 多重 RT-PCR 反应体系的优化 为了摸索出既高效又经济的多重 RT-PCR 扩增体系,在保证 2 个反应体系中都有足够量的 *r-Taq* DNA 聚合酶和



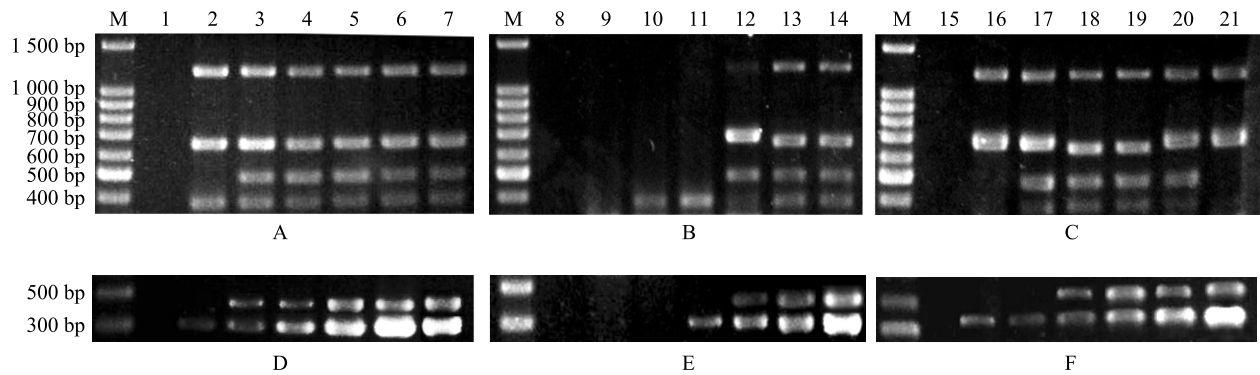
M:100 bp Marker;1:阴性对照;2~5:单重 RT-PCR 分别单独扩增 CMV、WMV、CGMMV 和 ZYMV;6:多重 RT-PCR 扩增 CMV、WMV、CGMMV 和 ZYMV 4 种病毒混合样;7、8:单重 RT-PCR 分别单独扩增 TMV 和 PRSV;9:多重 RT-PCR 扩增 TMV 和 PRSV 2 种病毒混合样。

图 1 多重 RT-PCR 的特异性

Fig.1 Specificity of multiple RT-PCR

dNTPs 的基础上,设置 dNTPs、*r-Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 的浓度梯度。结果(图 2)表明:当 dNTPs 浓度在 0.25 ~ 0.85 mmol/L 时,4 重和 2 重 PCR 都能产生较好的条带;当 *r-Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.10 ~ 0.12 U/ μ l 时,4 重 PCR 能扩增出 4 条带,2 重 PCR 能扩增出 2 条带,浓度越高条带越亮;当 Mg^{2+} 浓度达到 3.0 mmol/L 时,4 重和 2 重 PCR 都能分别较好地扩增出 4 条和 2 条特异性条带,随浓度增加条带变亮,但 4 重 PCR 中浓度增加到一定值后反而减弱了 mRT-PCR 的扩增效果。因此优化后的 4 重和 2 重反应体系各参数最终都确定为:dNTPs 浓度 0.25 mmol/L,*r-Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.10 U/ μ l, Mg^{2+} 浓度 3.0 mmol/L。

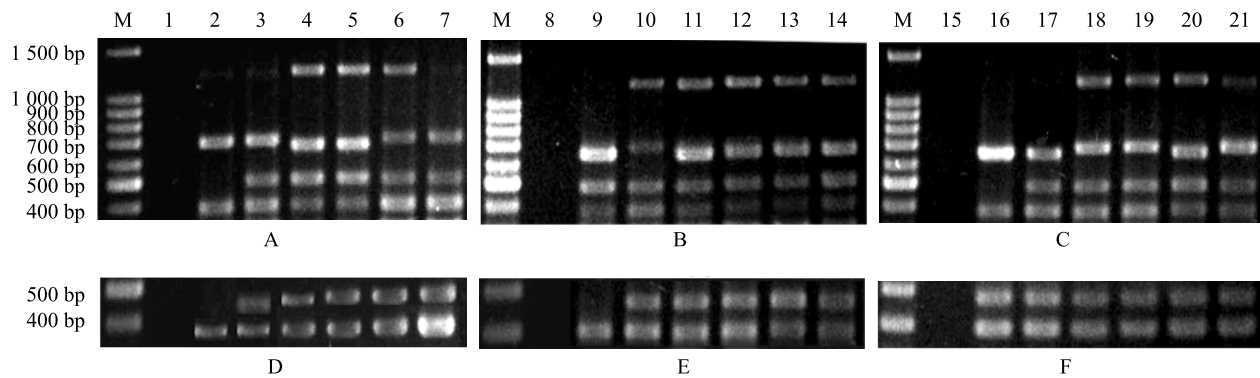
2.2.2 多重 RT-PCR 反应条件的优化 对 4 重和 2 重 PCR 的退火温度、循环次数和延伸时间都进行了优化。结果(图 3)显示,4 重 PCR 的退火温度从 53 $^{\circ}$ C 到 58 $^{\circ}$ C 都能获得理想的条带,但 61 $^{\circ}$ C 时扩增效果变弱;循环数在 30 ~ 40 次时扩增的条带都较清晰,延伸时间 80 s 时 PCR 条带的亮度最为合适。2 重 PCR 的退火温度从 53 $^{\circ}$ C 到 61 $^{\circ}$ C 时条带都较为清晰;循环数 25 ~ 35 次时均能获得特异而清晰的目的条带;延伸时间从 50 s 到 80 s 均能同时出现 2 条带,但在 60 s 时条带最清晰。因此最终确定多重 RT-PCR 反应的条件为:4 重 PCR 的退火温度为 53 $^{\circ}$ C,循环次数 35 次,延伸时间 80 s;2 重 PCR 的退火温度为 56 $^{\circ}$ C,循环次数 30 次,延伸时间 60 s。



A、B、C; 4 重 RT-PCR; D、E、F; 2 重 RT-PCR。M: 100 bp Marker; 1、8、15; 阴性对照; 2~7: 不同 dNTPs 浓度, 依次为 0.10 mmol/L、0.25 mmol/L、0.40 mmol/L、0.55 mmol/L、0.70 mmol/L、0.85 mmol/L; 9~14: 不同 *r-Taq* DNA 聚合酶量, 依次为 0.02 U/ μ l、0.04 U/ μ l、0.06 U/ μ l、0.08 U/ μ l、0.10 U/ μ l、0.12 U/ μ l; 16~21: 不同 Mg^{2+} 浓度, 依次为 1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、3.0 mmol/L、4.0 mmol/L、5.0 mmol/L、6.0 mmol/L。

图 2 多重 RT-PCR 反应体系的优化

Fig. 2 Optimization for the reaction conditions of mRT-PCR



A、B、C; 4 重 RT-PCR; D、E、F; 2 重 RT-PCR。M: 100 bp Marker; 1、8、15; 阴性对照; 2~7: 不同退火温度, 依次为 48 $^{\circ}$ C、51 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C; 9~14: 不同循环次数, 依次为 20、25、30、35、40、45; 16~21: 不同延伸时间, 依次为 50 s、60 s、70 s、80 s、90 s、100 s。

图 3 多重 RT-PCR 反应条件参数的优化

Fig. 3 Optimization for the reaction conditions of mRT-PCR

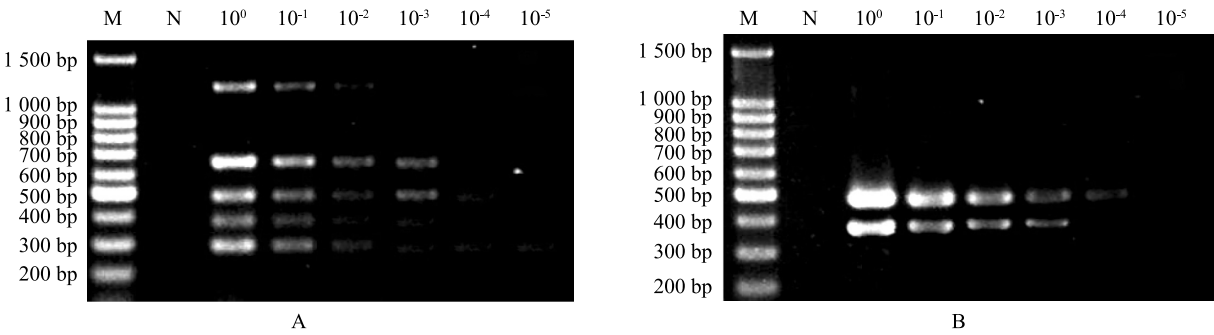
2.3 多重 RT-PCR 产物的序列分析

4 重和 2 重 RT-PCR 扩增产物经割胶回收, 分别与 pMD 18-T vector 进行体外连接, 挑取阳性克隆, 提取质粒测序。测序结果表明, ZYMV、WMV、CMV、CGMMV、TMV 和 PRSV 的扩增产物序列分别由 1 180、485、389、660、410 和 325 个核苷酸组成, 与设计的 PCR 产物大小相同, 分别为 *ZYMV-cp* 基因、*WMV-cp* 基因、*CMV*-复制酶基因、*CGMMV-cp* 基因、*TMV-cp* 基因和 *PRSV-cp* 基因的部分序列。序列同源性分析结果表明, 所得序列与 GenBank 中参考序列的同源性分别达到 98.25%、99.01%、99.93%、98.22%、97.33% 和 99.32%, 证明了 2 种多重 RT-

PCR 检测结果的可靠性。

2.4 多重 RT-PCR 的灵敏度

经核酸蛋白检测仪测定 H4 和 H2 的 RNA 浓度分别为 35.60 μ g/ μ l 和 19.33 μ g/ μ l。灵敏度检测结果(图 4)显示, 4 重 RT-PCR 中 RNA 稀释倍数为 10^{-2} 后有些病毒的条带微弱或消失, 这可能与组织中病毒含量的过低有关, 所以能够同时检测到 4 条清晰条带的最大稀释倍数为 10^{-2} , 也即该体系中 4 重 RT-PCR 的 RNA 检测浓度为 0.356 μ g/ μ l; 2 重 RT-PCR 中 RNA 稀释倍数为 10^{-3} 时能够同时检测到 2 条清晰的条带, 所以该体系中 2 重 RT-PCR 的 RNA 检测浓度为 19.33 ng/ μ l。



A:4 重 PCR;B:2 重 PCR。M:100 bp Marker;N:阴性对照。

图 4 2 个多重 RT-PCR 的灵敏度

Fig.4 The sensitivities of two mRT-PCR techniques

2.5 多重 RT-PCR 的检测应用

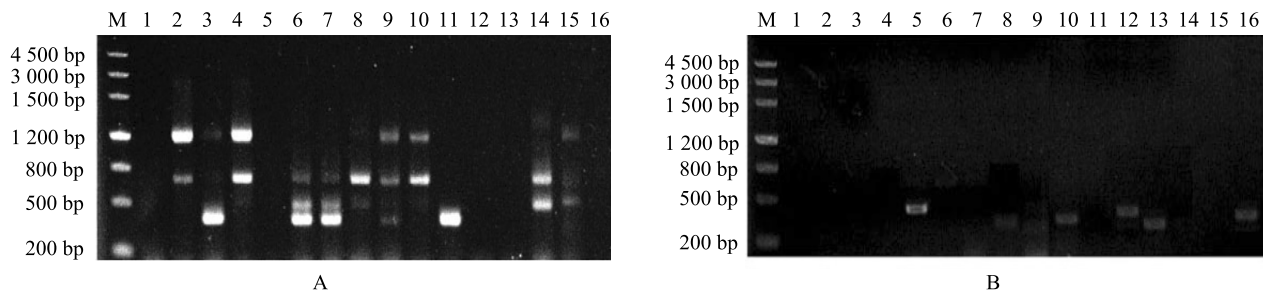
应用建立的 2 种多重 RT-PCR 方法对采自江苏省 13 个市县 210 份葫芦科作物病样进行检测。首先随机选出 15 个病样分别进行单重 RT-PCR 检测,再进行 2 种多重 RT-PCR 检测(图 5)。将检测图谱进行比较,结果显示各样品多重 RT-PCR 检测结果与单重 RT-PCR 结果相一致,说明建立的 2 种多重 RT-PCR 方法可应用于田间样品的检测。田间样品检测结果(表 2)表明,210 份检测样品中单独侵染

率仅为 24.76%,复合侵染率达 75.24%,其中有 3 个病样为 6 种病毒的复合侵染。进一步分析发现江苏省 13 个市县葫芦科作物病毒的种类以 ZYMV 和 CGMMV 为主,主要分布在西瓜、南瓜、葫芦、甜瓜等作物上,WMV 和 CMV 次之,主要分布在黄瓜、甜瓜、南瓜等作物上,TMV 和 PRSV 只在极少数作物上检测到,主要在丝瓜、南瓜等上。6 种病毒没有明显的地域分布倾向,究其原因可能与这几种病毒的传播途径有关。

表 2 田间 210 份葫芦科作物病样多重 RT-PCR 检测结果

Table 2 Detection results of 210 naturally infected samples collected from fields by multiplex RT-PCR

采集地点	样品数	阳性样品数					
		6 种病毒	5 种病毒	4 种病毒	3 种病毒	2 种病毒	1 种病毒
江苏南京	33	0	2	7	10	9	5
江苏宿迁	20	1	1	3	6	2	7
江苏徐州	15	0	1	2	5	3	4
江苏泰州	18	0	1	3	5	8	1
江苏盐都	10	0	0	1	2	3	4
江苏洪泽	17	0	2	1	5	6	3
江苏高邮	15	0	0	2	3	5	5
江苏兴化	10	0	0	1	2	4	3
江苏常州	10	0	1	2	2	1	4
江苏金坛	10	0	0	1	4	2	3
江苏姜堰	20	2	2	4	6	3	3
江苏东台	20	0	1	4	3	7	5
江苏东海	12	0	1	1	3	2	5
共计	210	3	12	32	56	55	52



A: 4 重 RT-PCR; B: 2 重 RT-PCR。M: 100 bp Marker; 1: 阴性对照; 2~16: 田间采集的葫芦科作物部分病样。

图 5 多重 RT-PCR 的检测应用

Fig. 5 The detection of six viruses in Cucurbit crops by mRT-PCR

3 讨论

江苏省是农业大省,近年来设施农业迅猛发展,据统计近几年江苏省葫芦科作物的种植面积每年稳定在400 000 hm²左右,其中西瓜和甜瓜种植面积约130 000 hm²,已经成为江苏省农业的支柱产业之一。设施农业的发展,使病毒及其传毒蚜虫在棚内顺利越冬后,在早春即散布于棚外并大量复制和繁殖,从而导致病害的提前发生和生长季节早期病毒累积量的偏高,形成恶性循环。以上因素加大了病毒病的发生频率,提高了流行风险,从而加重了病害。根据前期我们对江苏省设施大棚中葫芦科作物病毒病的调查,发现4种主要病毒(ZYMV、WMV、CMV、CGMMV)对葫芦科作物种植业造成的危害日趋严重,2种次要病毒(TMV和PRSV)的危害也不容忽视。本研究根据江苏省葫芦科作物生产上病毒病的发生情况,建立了能同时检测这6种病毒的多重RT-PCR方法,在葫芦科作物的栽培生产中,能够既快速、准确,又简便、经济地检测出幼苗带毒情况。对控制病害在田间的发生,减少经济损失,抗病筛选和病害流行预测具有十分重要的意义。

考虑到6种病毒的特点和数量,将其检测分成2个RT-PCR反应进行,一个PCR反应中同时检测4种主要病毒(WMV、ZYMV、CMV、CGMMV),另一个RT-PCR反应中同时检测2种次要病毒(TMV和PRSV)。该方法的关键因素为特异性引物的选择,首先使用DNAMAN5.0软件,对GenBank中收录的WMV、ZYMV、CMV、CGMMV、TMV和PRSV病毒各株系、各区域分离物全基因组序列进行比对,确定病毒序列中相对保守区域,在选定的保守区域内使用

Oligo5.0软件设计引物,再通过BLAST分析确保引物的特异性,还利用DNASTar 5.0对这6对引物进行了同源性、二级结构分析,以避免2个多重RT-PCR反应引物之间形成复杂的二级结构及引物二聚体而影响扩增效果,最终选择了G+C含量为45%~60%、退火温度相近、扩增片段大小易区分的6对引物。在反转录中选择了OligodT18作为其引物,此引物较为适合植物样品RNA的反转录,能够较为完整地保留cDNA基础含量,特异性较高,而且只需一次反转录,大大节省了时间和实验材料。在2个RT-PCR反应中又整合优化了各自体系所需的引物、Mg²⁺、DNA聚合酶、dNTPs浓度,以及退火温度、延伸温度和循环数,对各自PCR体系的灵敏度进行了测定,最终建立了6种病毒多重RT-PCR的方法。用此方法对江苏的210份葫芦科作物病样进行检测,结果显示多重RT-PCR和单重RT-PCR检测结果相当,充分说明了多重RT-PCR方法的实用性。跟踪监测2014年江苏省设施大棚中葫芦科作物的病毒种类,发现主要以种子传播的CGMMV和ZYMV病毒为主,提示我们此病害的控制应从源头出发,对种子和幼苗进行早期检测和处理,也体现了快捷、高效、低成本检测方法研制的必要性。

本研究根据江苏省生产上葫芦科作物易受多种病毒复合侵染的特点,选择性地对这些病毒进行了2种多重RT-PCR筛选鉴定,较之单一RT-PCR方法具有能节省时间、降低成本、提高效率等优点。以往报道的5重及以上RT-PCR方法^[12-16]在实际应用过程中存在干扰因素多、灵敏度低和检出率低等缺陷,本方法能够减少污染和反应中的影响因素,提高检测灵敏度,大大降低漏检几率。在葫芦科作物的生

产上,本方法可实现对病毒病的早期诊断,实现实验室内对病毒病害种类的快速、高效、低成本、大批量检测,对病害的流行预测预报具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] PROVIDENTI R. Resistance to viral disease of cucurbits. Resistance to viral disease of vegetables: genetics and breeding [M]. Oregon: Timber Press, 1993: 8-43.
- [2] ABOU J Y, SOBH H E, ZAMMAR S, et al. Incidence and management of virus disease of cucurbits in Lebanon [J]. Crop Protection, 2000, 19(4): 217-224.
- [3] 陈洁云, 陈集双, 柴立红, 等. 两种葫芦科病毒的分子检测和致病性研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 449-455.
- [4] 古勤生. 葫芦科作物主要病毒病防治研究进展[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(4): 27-30.
- [5] 任春梅, 程兆榜, 缪倩, 等. 江苏西瓜花叶病毒的分子鉴定和序列分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(9): 1464-1470.
- [6] LIN S S, HOU R F, YEH S D. Hetroduplex mobility and sequence analyses for assessment of variability of zucchini yellow mosaic virus [J]. Phytopathology, 2000, 90(3): 228-235.
- [7] LIN H X, RUBIO L, SMYTHE A, et al. Genetic diversity and biological variation among California isolates of cucumber mosaic virus [J]. Journal of General Virology, 2003, 84: 249-258.
- [8] 任春梅, 程兆榜, 缪倩, 等. 江苏黄瓜绿斑花叶病毒的鉴定[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 65-70.
- [9] 黄金光, 邓丛良, 范在丰, 等. 烟草花叶病毒丁香分离物的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 215-222.
- [10] KO S J, LEE Y H, CHO M S, et al. The incidence of virus diseases on melon in Jeonnam Province during 2000-2002 [J]. Plant Pathol J, 2007, 23: 215-218.
- [11] CHAMBERIAN J S, GIBBS R A, RANIER J E, et al. Detection and screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 1141-1156.
- [12] DAI J, CHENG J L, HUANG T, et al. A multiple reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 183: 57-62.
- [13] BHAT A I, SIJU S. Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of cucumber mosaic virus and piper yellow mottle virus associated with stunt disease of black pepper [J]. Current Science, 2007, 93: 973-976.
- [14] UGA H, TSUDA S. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple topovirus infections [J]. Phytopathology, 2005, 95: 166-171.
- [15] SUGIYAMA S, MASUTA C, SEKIGUCHI H, et al. A simple, sensitive, specific detection of mixed infection of multiple plant viruses using macroarray and microtube hybridization [J]. Journal of Virological methods, 2008, 153: 241-244.
- [16] 牛建新, 马兵钢, 何梅, 等. 库尔勒香梨主要病毒多重 RT-PCR 检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 12-21.
- [17] YU C, WU J X, ZHOU X P. Detection and subgrouping of cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 23: 155-161.
- [18] 王威麟, 张昊, 于祥泉, 等. 侵染西瓜的5种病毒 ZYMV、WMV、TMV、SqMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 检测体系的建立与检测应用[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 27-32.
- [19] 赵丽, 古勤生, 陈红运, 等. 葫芦科作物3种主要病毒的多重 RT-PCR 方法的建立[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 703-707.
- [20] KWON J Y, HONG J S, KIM M J, et al. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 206: 133-139.
- [21] NIE X H, SINGH R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiple RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86: 155-161.

(责任编辑:张震林)