

华明艳, 宋兰芳, 付成龙, 等. 基于微滴式数字 PCR 技术检测番茄褐色皱纹果病毒方法的建立与评价[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(5): 929-939.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.05.007

# 基于微滴式数字 PCR 技术检测番茄褐色皱纹果病毒方法的建立与评价

华明艳<sup>1</sup>, 宋兰芳<sup>1</sup>, 付成龙<sup>2</sup>, 崔少杰<sup>1</sup>, 孙海波<sup>1</sup>, 靳力争<sup>1</sup>, 金凤媚<sup>1</sup>

(1.天津市农业科学院现代都市农业研究所,天津 300192; 2.山东蒙恩现代农业发展有限公司,山东 聊城 252000)

**摘要:** 番茄褐色皱纹果病毒(Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)病作为威胁全球番茄产业的重要病害,具有早期无症状、传播速度快、危害程度重等特点。为建立 ToBRFV 的高效精准检测方法、实现番茄褐色皱纹果病毒病的有效防控,本研究通过设计 ToBRFV CP 基因保守区域特异性引物,构建质粒标准品,建立基于微滴式数字 PCR(ddPCR)的 ToBRFV 检测方法(ddPCR法),并将 ddPCR法与实时荧光定量 PCR(qPCR)检测方法进行系统比较。结果表明,ddPCR法对 ToBRFV 的检测下限为 1 μL 1.9×10<sup>0</sup> 拷贝,而 qPCR 方法对 ToBRFV 的检测下限为 1 μL 1.9×10<sup>2</sup> 拷贝,且 ddPCR 法仅对 ToBRFV 呈现阳性扩增,而对番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)等田间常见病毒无交叉反应。基于 ddPCR 方法对 30 份田间疑似感染 ToBRFV 的样本进行检测,阳性检出率达 93.3%,显著高于 qPCR 方法的 76.7%。综上,本研究建立的 ddPCR 检测方法在 ToBRFV 早期诊断、低载毒量样本检测及田间精准筛查中表现出检测下限低、特异性强和漏检风险低等优势,可有效应用于 ToBRFV 的流行监测,为 ToBRFV 的科学防控及番茄产业健康发展提供技术支撑。

**关键词:** 番茄褐色皱纹果病毒; 微滴式数字 PCR; 检测方法; 灵敏度

**中图分类号:** S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)05-0929-11

## Establishment and evaluation of a method for detecting tomato brown rugose fruit virus based on droplet digital PCR technology

HUA Mingyan<sup>1</sup>, SONG Lanfang<sup>1</sup>, FU Chenglong<sup>2</sup>, CUI Shaojie<sup>1</sup>, SUN Haibo<sup>1</sup>, JIN Lizheng<sup>1</sup>, JIN Fengmei<sup>1</sup>

(1. Institute of Modern Urban Agriculture, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300192, China; 2. Shandong Meng'en Modern Agricultural Development Co., Ltd., Liaocheng 252000, China)

**Abstract:** Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) disease is an important disease that threatens the global tomato industry. It has the characteristics of early asymptomatic, rapid transmission and severe damage. In order to establish an efficient and accurate detection method for ToBRFV and realize the effective prevention and control of tomato brown rugose

收稿日期: 2025-10-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1201503); 天津市重点研发计划项目(23YFZCSN00160); 2025 年农业主导产业自主创新科研项目(2025ZYCX012); 泰山产业领军人才工程(TSCY20231269)

作者简介: 华明艳(1983-), 女, 辽宁建平人, 硕士, 助理研究员, 主要从事番茄及草莓分子育种研究。(E-mail) 26764891@qq.com

通讯作者: 金凤媚, (E-mail) Jinfm414@163.com

fruit virus disease, this study designed specific primers for the conserved region of ToBRFV CP gene and constructed plasmid standards. The ToBRFV detection method based on droplet digital PCR (ddPCR) was successfully established, and the ddPCR method was systematically compared with the real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) detection method. The results showed that the detection limit of ddPCR for ToBRFV was 1.9 × 10<sup>0</sup> copies per

microliter, while the detection limit of qPCR for ToBRFV was  $1.9 \times 10^2$  copies per microliter. The ddPCR method only showed positive amplification for ToBRFV, but had no cross-reactions with tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mosaic virus (TMV) and tomato spotted wilt virus (TSWV). Based on the ddPCR method, 30 samples suspected to be infected with ToBRFV in the field were tested, and the positive detection rate was 93.3%, which was significantly higher than 76.7% of the qPCR method. In summary, the ddPCR detection method established in this study showed the advantages of low detection limit, strong specificity and low risk of missed detection in the early diagnosis of ToBRFV, the detection of low-load samples and the accurate screening in the field. It can be effectively applied to the epidemic monitoring of ToBRFV and provide technical support for the scientific prevention and control of ToBRFV and the healthy development of tomato industry.

**Key words:** tomato brown rugose fruit virus; droplet digital PCR; detection method; sensitivity

番茄作为全球广泛种植的蔬菜作物,在农业经济中占据重要地位<sup>[1]</sup>。番茄种植过程中经常受到病毒的威胁,如番茄花叶病毒(Tomato mosaic virus, ToMV)、烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)、番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV),近几年新出现了番茄褐色皱纹果病毒(Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)。ToBRFV自2016年在约旦首次报道以来,已迅速蔓延至欧洲、亚洲、北美洲等地区,对上述地区的番茄及辣椒等茄科作物生长造成严重危害<sup>[2-4]</sup>。ToBRFV属于杆状病毒科烟草花叶病毒属,为正义链单链RNA病毒,其显著特点是作物植株感染早期无明显症状,导致ToBRFV的早期诊断难度较大。此外,针对ToBRFV目前尚无有效防治药剂及抗性作物品种,一旦ToBRFV暴发流行,极易造成区域性作物植株发病,给种植户带来严重经济损失<sup>[5-9]</sup>。

目前,ToBRFV的检测方法已得到初步研究。Van de Vossenbergh等<sup>[10]</sup>利用高通量测序(NGS)技术进行ToBRFV检测,但该方法检测成本高、周期长。Alfaro-Fernández等<sup>[11]</sup>、Yan等<sup>[12]</sup>利用酶联免疫(ELISA)法进行ToBRFV检测,但该方法灵敏度低、特异性差。Sarkes等<sup>[13]</sup>研究发现,环介导等温扩增(LAMP)法检测ToBRFV时易出现假阳性且成本较高。基于逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及实时荧光定量PCR(qPCR)等方法检测ToBRFV虽具备较高的灵敏度和特异性,但亦存在显著的技术瓶颈。qPCR使用的SYBR Green染料能非特异性结合双链DNA,这可能使得qPCR结果中常出现杂带,进而导致检测结果出现偏差;TaqMan探针法qPCR虽能提升检测结果的特异性,但检测下限一般在 $1 \mu\text{L } 1 \times 10^2$ 拷贝以上,无法捕捉感染早期作物植株中的微量病毒<sup>[14-18]</sup>;此外,所有qPCR方法均依赖标准曲线和扩增效率,难以实现绝对定量。近年

来,基于微滴式数字PCR技术(ddPCR)的作物病毒检测方法得到了快速发展。ddPCR技术基于单分子计数原理,通过将反应体系分割为数万个独立微滴进行PCR扩增,可实现对目标核酸的绝对定量,且不受标准曲线和扩增效率影响,在低浓度样本检测中具有独特优势<sup>[19-22]</sup>。目前,ddPCR技术在马铃薯S病毒(Potato virus S, PVS)、马铃薯M病毒(Potato virus M, PVM)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)、凤果花叶病毒(Pepino mosaic virus, PepMV)、柑橘黄化脉明病毒(Citrus yellow vein clearing virus, CYVCV)、马铃薯帚顶病毒(Potato mop top virus, PMTV)、葡萄灰皮诺病毒(Grapevine pinot gris virus, GPGV)及苹果褪绿果斑类病毒(Apple chlorotic fruit spot viroid, ACFSVd)等多种病毒的检测中得到应用,其检测灵敏度是RT-PCR方法的10~100倍<sup>[18]</sup>。且ddPCR检测方法具备广泛的样本适配性,能够检测种子、幼苗、果实、杂草等多元样本中的病毒水平,可满足田间病害监测、种苗繁育质量把控等多个环节中病毒精准检测需求,为植物病毒的早期防控、国际贸易中种苗安全检疫提供重要的技术支撑<sup>[19]</sup>。

鉴于ddPCR技术对番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)检测方法尚未建立现状,本研究通过设计特异性引物,建立基于ddPCR技术的ToBRFV检测方法,分析ddPCR检测体系的灵敏度、特异性、重复性及田间适用性,并对其与常用的qPCR方法进行对比验证,旨在为ToBRFV的早期预警、精准防控及种苗检疫提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)、番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)和番茄斑萎病毒(TSWV)来源于天津市农业科学院留存样本。疑似

感染 ToBRFV 的样本于2024-2025 年从山东寿光、江苏淮安及安徽淮南的番茄种植基地采集,各基地分别采集 10 份,共 30 份,保存于-80 °C 冰箱。

pCB301 载体购自宝赛生物科技有限公司; DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;数字 PCR Mix 及数字 PCR 荧光染料购自深圳博瑞生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、cDNA 合成试剂、RT-PCR 试剂均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 为设计特异性与保守性兼具的 ToBRFV 检测引物,从 NCBI 数据库下载全球不同地理来源的 ToBRFV 基因组序列(表 1)。选取表 1 中

表 1 本研究使用的病毒分离物信息

Table 1 Information of different virus isolates used in this study

序号	登录号	病毒名称	来源地	寄主	序号	登录号	病毒名称	来源地	寄主
1	MT018320.1	ToBRFV	中国	番茄	15	MW822012.1	TSWV	中国	辣椒
2	OR795502.1	ToBRFV	中国	番茄	16	PV916758.1	ToMV	印度	番茄
3	OR760198.1	ToBRFV	荷兰	番茄	17	PV916759.1	ToMV	印度	番茄
4	PP796738.1	ToBRFV	中国	番茄	18	MZ388458.1	ToMV	中国	番茄
5	PQ492152.1	ToBRFV	巴基斯坦	番茄	19	MH393623.1	ToMV	韩国	甜椒
6	PV701257.1	ToBRFV	中国	番茄	20	OR795502.1	ToBRFV	中国	番茄
7	PV701255.1	ToBRFV	中国	番茄	21	OR760198.1	ToBRFV	荷兰	番茄
8	MZ945419.1	ToBRFV	比利时	番茄	22	PP796738.1	ToBRFV	中国	番茄
9	MZ945420.1	ToBRFV	比利时	番茄	23	PQ492152.1	ToBRFV	巴基斯坦	番茄
10	OR593752.1	ToBRFV	中国	番茄	24	PV916762.1	TMV	印度	番茄
11	PQ592515.1	ToBRFV	加拿大	番茄	25	OL471714.1	TMV	南非	烟草
12	PQ566622.1	TSWV	韩国	番茄	26	MN912489.1	TMV	巴西	灯笼果
13	KX611497.1	TSWV	中国	辣椒	27	AF395129.1	TMV	中国	烟草
14	MZ005203.1	TSWV	中国	辣椒					

ToBRFV、ToMV、TMV、TSWV 分别为番茄褐色皱纹果病毒、番茄花叶病毒、烟草花叶病毒、番茄斑萎病毒。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 采集番茄果实发病部位 0.1 g,加液氮研磨成粉,用 MiniBEST plant RNA 提取试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司产品]提取总 RNA。取 RNA 1.0  $\mu$ L、寡脱氧胸腺苷酸[Oligo(dT)] 1.0  $\mu$ L、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP) 0.5  $\mu$ L,混合后用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)补足至 10.0  $\mu$ L。65 °C 变性 5 min 后,置于冰上 2 min,然后加入 5 $\times$ M-MLV 反转录缓冲液 5.0  $\mu$ L、M-MLV 逆转录酶 1.0  $\mu$ L、RNA 酶抑制剂 0.5  $\mu$ L,用 ddH<sub>2</sub>O 补足 20.0  $\mu$ L,42 °C 保温 1 h,得到 cDNA。

序号 1~ 序号 11 的 ToBRFV 全基因组序列,利用 MEGA11 软件进行多序列比对,在外壳蛋白(CP)基因中筛选出变异率<0.5%的保守区域(图 1)。为排除交叉反应风险,进一步将 CP 基因保守区域与近缘病毒番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)的同源序列进行比对,验证 ToBRFV CP 基因保守区域的特异性(图 2)。

基于上述筛选出的 CP 基因保守区域,利用 Primer3.0 在线工具设计 qPCR 与 ddPCR 专用引物(命名为 ToBRFV-CqF/ToBRFV-CqR)及常规 PCR 引物(命名为 ToBRFV-1F/ToBRFV-1R),引物对的扩增长度分别为 111 bp 和 6 420 bp(表 2)。

1.2.3 质粒标准品的制备 利用引物 ToBRFV-1F 和 ToBRFV-1R 进行 RT-PCR 扩增,回收目的片段与 pCB301 载体连接后转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,转化成功后利用质粒提取试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司产品]提取质粒,经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行测序鉴定。测序正确的质粒样品使用 NanoDrop ND-100 核酸蛋白仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]测得质粒浓度,并利用下列公式计算阳性质粒的拷贝数:

$$\text{拷贝数} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{质粒质量浓度}) / (\text{DNA 长度} \times 660)$$

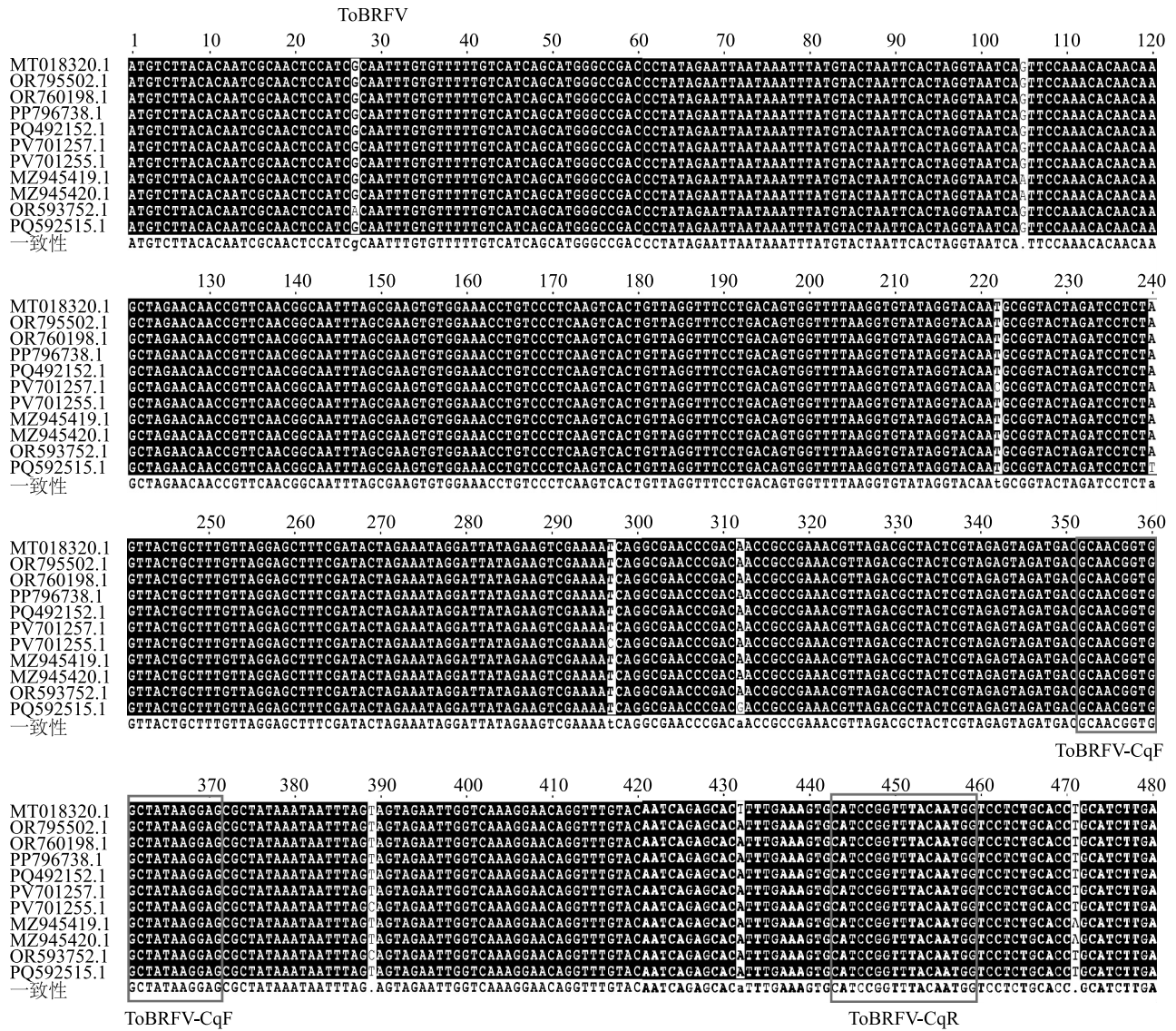


图1 番茄褐色皱纹果病毒不同分离物 CP 基因同源序列对比图

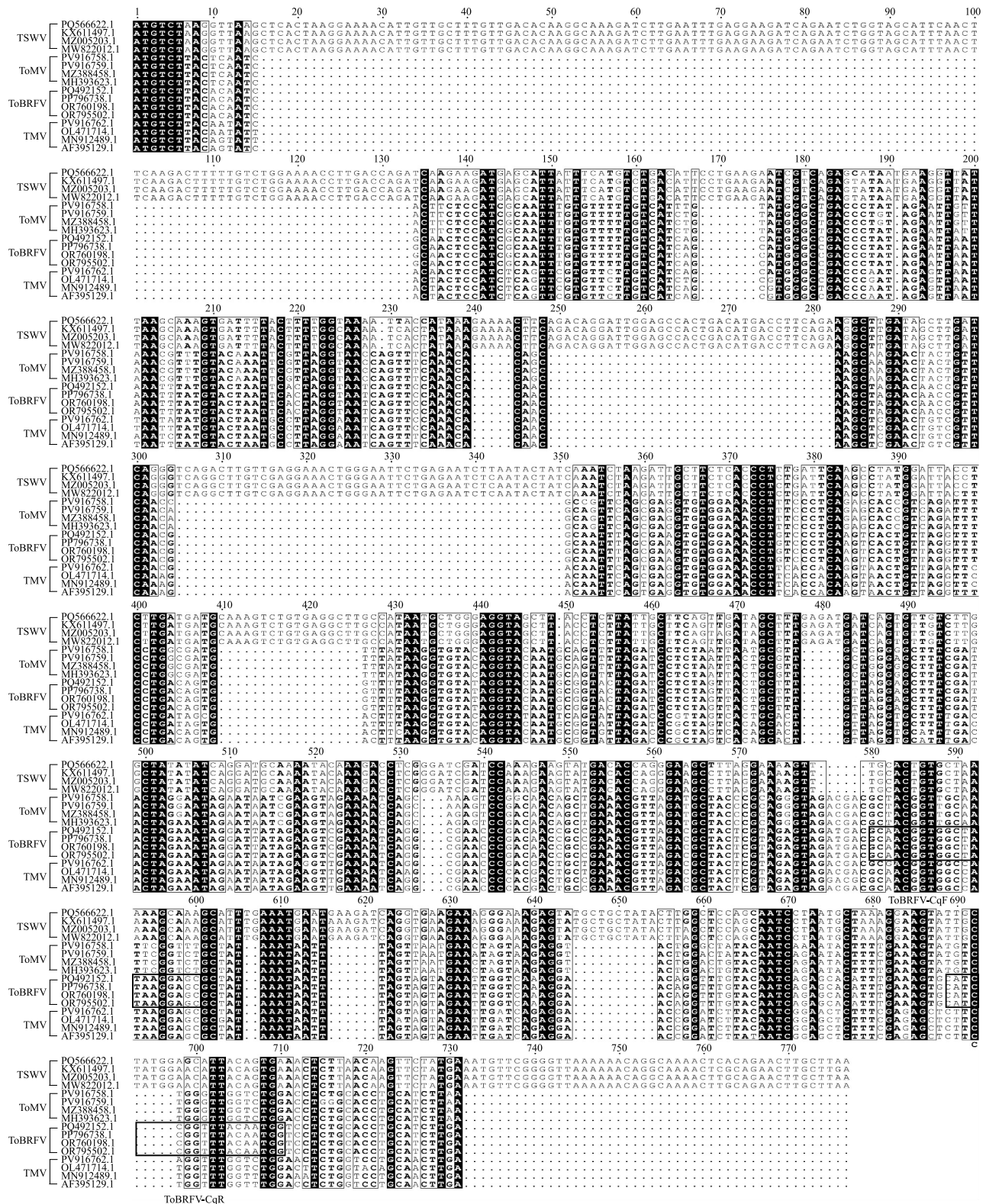
Fig.1 Comparison of homologous sequences of the CP gene among different tomato brown rusgose fruit virus isolates

将质粒标准品按 10 倍梯度进行逐级稀释至低拷贝浓度,进行后续的 ddPCR 检测和 qPCR 检测。

1.2.4 ddPCR 检测方法的建立 以质粒标准品为模板,ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR 为引物,利用 S6 数字 PCR 仪(深圳博瑞生物科技有限公司产品)进行 ddPCR 检测。每个样品重复 3 次。ddPCR 扩增体系 20.0 μL,包括模板 2.0 μL、10.0 μmol/L 上游引物和下游引物各 0.8 μL、2×数字 PCR Mix 10.0 μL、荧光染料 0.5 μL、Taq 酶 0.4 μL、ddH<sub>2</sub>O 5.5 μL。将 20.0 μL 反应液缓慢加入芯片样本池的油相中,盖上盖子,

撕掉芯片底部的防尘薄膜,将芯片放入数字 PCR 仪器中进行检测。ddPCR 检测程序为 95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 45 s,40 个循环。

1.2.5 ddPCR 引物特异性检测 分别提取番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)和番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)的总 RNA,并反转录合成 cDNA,将其拷贝数稀释至 1 μL 1×10<sup>3</sup> 拷贝,以稀释后的 cDNA 为模板,利用引物 ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR 进行 ddPCR。ddPCR 扩增体系及检测程序同方法 1.2.4。每个样品重复 3 次。



左侧字符串为分离物登录号,见表1。TSWV:番茄斑萎病毒;ToMV:番茄花叶病毒;ToBRFV:番茄褐色皱纹果病毒;TMV:烟草花叶病毒。数据1~770表示碱基数,单位为bp。

图2 番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)、番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄斑萎病毒(TSWV)不同分离物CP基因同源序列对比  
Fig.2 Comparison of CP gene homologous sequences of different isolates of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), tomato mosaic virus (ToMV), tobacco mosaic virus (TMV) and tomato spotted wilt virus (TSWV)

表 2 本研究使用的 PCR 引物

Table 2 Primers used in the experiment

引物名称	序列(5'→3')	片段大小(bp)
ToBRFV-1F	AGTTCATTTTCATTGGAGAGGCCTTATACCAACAACAACAACAAC	6 420
ToBRFV-1R	GAGATGCCATGCCGACCCGGGTGGGCCCTACCGGGGGTCCGGGGGAATTCGAATCCCTCGCTTTATTACGT	
ToBRFV-CqF	GCAACGGTGGCTATAAGGAG	111
ToBRFV-CqR	GGACCATTGTAACCGGATG	

1.2.6 qPCR 检测方法的建立 以质粒标准品为模板,ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR 为引物,利用 ABI Q3 实时荧光定量 PCR 仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]进行 qPCR 检测。qPCR 反应体系为 20.0  $\mu\text{L}$ ,包括质粒模板 1.0  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 上游引物和下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ 、TB Green Premix Ex Taq II 10.0  $\mu\text{L}$ 、羧基-X-罗丹明(ROX)参比染料 0.4  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 7.0  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,40 个循环。每个样品重复 3 次。

1.2.7 qPCR 标准曲线的建立 以不同稀释倍数的标准质粒作为模板,参照方法 1.2.6 进行 qPCR 扩增。以循环阈值(*C<sub>t</sub>*)为纵坐标,以标准品拷贝数的对数为横坐标,建立 qPCR 标准曲线。

1.2.8 田间样本检测 对田间采集的 30 个疑似感染 ToBRFV 的样本,分别提取总 RNA 并反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,分别利用引物 ToBRFV-

CqF/ToBRFV-CqR 进行 qPCR 和 ddPCR 检测,比较 2 种检测方法的效果。

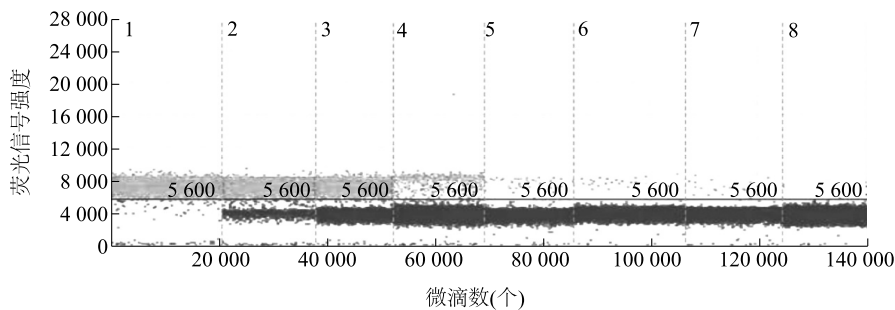
## 2 结果与分析

### 2.1 质粒标准品浓度测定

RT-PCR 扩增片段与 pCB301 载体连接并转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞转化成功后,提取的质粒经测序鉴定,计算得到阳性质粒的拷贝数为 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^9$  拷贝。

### 2.2 ddPCR 检测方法的建立

利用 ddPCR 技术对 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^6$  拷贝至 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^{-1}$  拷贝的稀释质粒标准品进行检测,结果如图 3 所示。从图中可以看出,当质粒标准品拷贝数高于 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^3$  拷贝时,检测信号饱和,超出检测上限;当拷贝数低于 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝时,无法检出;有效检测下限为 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝。这表明在特定含量范围内,ddPCR 方法可实现 ToBRFV 的绝对定量,无需依赖标准曲线。



1~8 分别为稀释后的质粒标准品拷贝数 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^6$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^5$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^4$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^3$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^1$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^{-1}$  拷贝。灰色为阳性微滴,黑色为阴性微滴。

图 3 不同稀释倍数质粒标准品的 ddPCR 检测结果

Fig.3 ddPCR detection results of plasmid standards with different dilution times

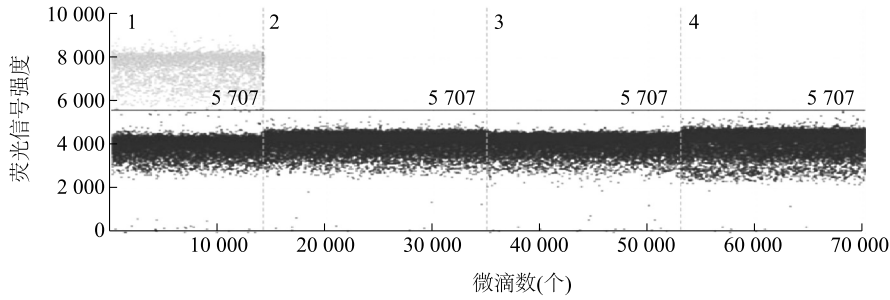
### 2.3 ddPCR 引物特异性检测

以 ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR 为引物,分别以番茄褐色皱纹果病毒(ToBRFV)、番茄花叶病毒(ToMV)、烟草花叶病毒(TMV)及番茄斑萎病毒(TSWV)为模板,进行 ddPCR 扩增,结果如图 4 所

示。从图中可以看出,4 种病毒中只有 ToBRFV 得到扩增,而其他 3 种病毒均未见有阳性扩增,这说明本研究选用的引物特异性较强。

### 2.4 qPCR 检测方法及其标准曲线的建立

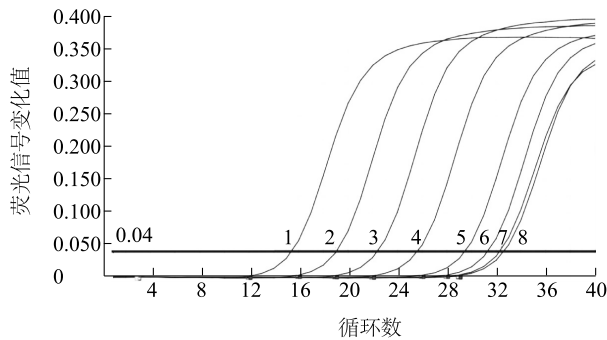
qPCR 扩增曲线如图 5 所示。从图中可以看



1: 番茄褐色皱纹果病毒 (ToBRFV); 2: 番茄花叶病毒 (ToMV); 3: 烟草花叶病毒 (TMV); 4: 番茄斑萎病毒 (TSWV)。灰色为阳性微滴, 黑色为阴性微滴。

图 4 ddPCR 引物 (ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR) 对不同病毒的检测结果比较

Fig.4 Comparison of ddPCR primers (ToBRFV-CqF and ToBRFV-CqR) for detection of different viruses



1~8 分别对应的模板拷贝数为: 1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^6$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^5$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^4$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^3$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^1$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝、1  $\mu\text{L}$   $1.9 \times 10^{-1}$  拷贝。

图 5 qPCR 扩增曲线

Fig.5 qPCR amplification curves

出, 当质粒标准品拷贝数低于  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝时, qPCR 循环阈值 ( $C_t$ ) 大于 30, 检测结果无效。以  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  至  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^6$  拷贝的 5 个含量标准品拷贝数和  $C_t$  值构建得到的标准曲线如图 6 所示。从图中可以看出, 标准曲线决定系数 ( $R^2$ ) = 0.999 3, 说明质粒标准品拷贝数在  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  至  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^6$  拷贝时, 拷贝数与  $C_t$  值之间存在较好的相关性, 可用于 qPCR 检测结果的定量分析。

2.5 ddPCR 与 qPCR 灵敏度和重复性比较结果

ToBRFV 质粒标准品 ddPCR 与 qPCR 检测灵敏度如表 3 所示。从表中可以看出, qPCR 检测方法的有效下限为  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝, 当标准品含量低于  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝时, 检测  $C_t$  值大于 30.00, 检测结果无效; 而 ddPCR 检测方法的有效下限低至  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝, 即 qPCR 检测方法的灵敏度是 qPCR 检测方法的 100 倍。由于 ddPCR 方法是基于单分

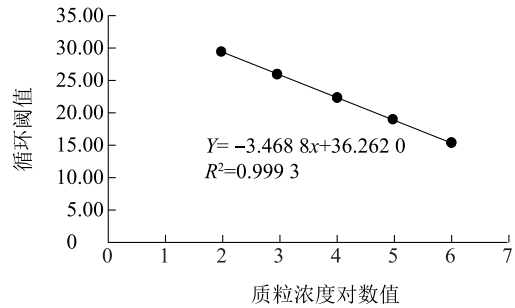


图 6 qPCR 标准曲线

Fig.6 Standard curve for qPCR

子计数原理, 通过将反应体系分割为数万个独立微滴进行扩增, 可实现绝对定量检测, 在低载毒量样本检测中优势显著。而 qPCR 方法则依赖于标准曲线和扩增效率, 这会给检测结果带来一定的误差。

qPCR 方法检测结果的变异系数为 2.00% ~ 4.50%, 整体稳定性较好; ddPCR 方法检测结果的变异系数为 1.40% ~ 8.00%。由此可见, 2 种检测方法的变异系数均  $\leq 10.00\%$ , 说明 2 种方法的检测结果均是可靠的。高含量样本 (如  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^2$  拷贝) ddPCR 方法检测结果变异系数相对较低, 而低含量样本 (如  $1 \mu\text{L}$   $1.9 \times 10^0$  拷贝) ddPCR 方法检测结果变异系数相对较高, 说明 ddPCR 方法检测结果的重复性低于 qPCR 方法。3 名操作人员间隔 7 d 基于 ddPCR 方法对 ToBRFV 质粒标准品检测的结果重复性如表 4 所示。从表中可以看出, 3 个样品拷贝数检测结果的变异系数为 1.10% ~ 7.30%, 表明在不同人员和不同时间背景下, 检测结果仍能保持较高的重复性。

表 3 番茄褐色皱纹果病毒质粒标准品 ddPCR 与 qPCR 灵敏度检测

Table 3 Sensitivity detection of tomato brown rugose fruit virus plasmid standards by ddPCR and qPCR

样品拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)	qPCR 循环阈值 ( <i>C<sub>t</sub></i> )	变异系数 (%)	换算拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)	ddPCR 拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)	变异系数 (%)
$1.9 \times 10^6$	15.60±0.57	3.70	$1.72 \times 10^6$	No Call	
$1.9 \times 10^5$	19.14±0.48	2.50	$1.64 \times 10^5$	No Call	
$1.9 \times 10^4$	22.66±0.76	3.30	$1.59 \times 10^4$	No Call	
$1.9 \times 10^3$	26.15±1.18	4.50	$1.56 \times 10^3$	1 124.00±22.91	2.00
$1.9 \times 10^2$	29.47±0.60	2.00	$1.72 \times 10^2$	145.91±2.01	1.40
$1.9 \times 10^1$	无效值			19.06±1.07	5.60
$1.9 \times 10^0$	无效值			1.85±0.15	8.00
$1.9 \times 10^{-1}$	无效值			0	

No Call 是指浓度过高, 检测信号饱和, 表现全阳性。无效值是指 *C<sub>t</sub>* 值大于 30.00。

表 4 番茄褐色皱纹果病毒质粒标准品 ddPCR 批间重复性比较

Table 4 Comparison of inter-assay reproducibility of ddPCR for tomato brown rugose fruit virus plasmid standards

样品拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)	ddPCR 拷贝数(拷贝, 1 $\mu$ L)			平均值 (拷贝, 1 $\mu$ L)	标准差 (拷贝, 1 $\mu$ L)	变异系数 (%)
	1 d	8 d	15 d			
$1.9 \times 10^2$	145.59	143.01	142.89	143.83	1.53	1.10
$1.9 \times 10^1$	20.06	18.55	18.85	19.15	0.80	4.20
$1.9 \times 10^0$	1.82	2.08	1.89	1.93	0.14	7.30

## 2.6 ddPCR 与 qPCR 检测田间样品比较

田间采集得到的疑似感染 ToBRFV 的 30 份样本的检测结果如表 5 和表 6 所示。利用 ddPCR 方法, 30 份疑似感染 ToBRFV 样本中共检出阳性样本 28 份, 阴性样本 2 份, 阳性检出率为 93.3%, 检测下

限为 1  $\mu$ L 11.05 拷贝。利用 qPCR 方法, 30 份疑似感染 ToBRFV 的样本中共检出阳性样本 23 份, 阴性样本 7 份, 检出阳性率为 76.7%, 检测下限为 1  $\mu$ L 164.66 拷贝。可见, ddPCR 方法在阳性检出率上表现更优, 且检测下限更低。

表 5 田间样品番茄褐色皱纹果病毒检测结果

Table 5 Tomato brown rugose fruit virus detection results of field samples

样品	ddPCR 拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)	变异系数 (%)	qPCR 循环阈值 ( <i>C<sub>t</sub></i> )	变异系数 (%)	换算拷贝数 (拷贝, 1 $\mu$ L)
1	4 710.29±151.15	3.20	24.36±0.29	1.20	5 137.79
2	+		15.90±0.21	1.30	1 411 432.02
3	1 236.97±5.58	0.50	25.96±0.13	0.50	1 776.32
4	11.05±0.83	7.50	-		
5	+		16.00±0.21	1.30	1 320 783.25
6	19.83±0.96		-		
7	+		15.90±0.20	1.25	1 413 307.08
8	0	0	-		
9	+		16.23±0.17	1.00	1 131 517.70
10	+		16.00±0.15	1.00	1 320 783.25
11	3 205.12±12.34	2.10	24.89±0.31	1.15	4 876.54

续表5 Continued5

样品	ddPCR 拷贝数 (拷贝, 1 μL)	变异系数 (%)	qPCR 循环阈值 (Ct)	变异系数 (%)	换算拷贝数 (拷贝, 1 μL)
12	+		15.80±0.20	1.25	1 398 765.31
13	890.65±4.21	0.45	25.78±0.12	0.48	1 654.32
14	13.52±1.01	6.80	-	-	-
15	19.83±0.96	4.80	-	-	-
16	507.77±14.64	2.90	27.52±0.59	2.13	627.90
17	2 747.70±15.89	0.60	25.07±0.04	0.17	3 200.59
18	2 389.33±41.04	1.70	25.43±0.03	0.10	2 520.27
19	358.21±6.19	1.70	28.30±0.08	3.28	375.04
20	2 010.33±9.50	0.50	25.47±0.36	1.41	2 449.35
21	2 550.13±18.96	0.70	25.25±0.24	0.95	2 859.05
22	350.57±6.04	1.70	27.86±0.08	0.27	502.25
23	541.47±14.00	2.60	27.42±0.56	2.04	670.82
24	113.76±3.12	2.70	29.54±0.04	4.10	164.66
25	993.27±6.01	0.60	26.31±0.2	0.80	1 402.47
26	15.34±0.75	3.50	-	-	-
27	620.45±16.32	3.10	26.85±0.62	2.05	750.28
28	0	0	-	-	-
29	3 100.22±18.50	0.70	24.92±0.05	0.20	3 500.75
30	2 000.15±35.60	1.60	24.35±0.04	0.12	2 200.30

+代表病毒阳性;-代表病毒阴性。

表 6 田间样品番茄褐色皱纹果病毒检测结果

Table 6 Statistics of tomato brown rugose fruit virus detection in field samples

检测方法	样本数量 (份)	检出阳性 (份)	检出阴性 (份)	检出率 (%)
qPCR	30	23	7	76.7
ddPCR	30	28	2	93.3

### 3 讨论

目前,基于荧光定量 RT-PCR 技术对 ToBRFV 进行检测已得到初步开展,总体来说检测灵敏度较高。李献锋等<sup>[23]</sup>建立了 ToBRFV 的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法,其对番茄种子总 RNA 和重组质粒标准品的检测下限分别为 0.2 ng/μL 和 1 μL 50.0 拷贝,均为常规 RT-PCR 检测灵敏度的 100 倍。与 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 技术相比, TaqMan 荧光定量 RT-PCR 技术在 ToBRFV 的检测方面表现出更高的灵敏度、准确性和稳定性<sup>[24]</sup>。但随

着数字 PCR 检测技术的发展和應用,作物病毒的检测灵敏度和准确度得到了进一步的提高,且数字 PCR 技术还具有绝对定量方面的优势<sup>[22]</sup>。

#### 3.1 ddPCR 检测方法的灵敏性

本研究结果表明,ddPCR 方法对 ToBRFV 的检测下限为 1 μL 1.9×10<sup>0</sup> 拷贝,而 qPCR 方法的检测下限为 1 μL 1.9×10<sup>2</sup> 拷贝,即 ddPCR 方法的检测灵敏度是 qPCR 检测方法的 100 倍,这与丁钿<sup>[25]</sup>的研究结果一致。此外,2 种检测方法的定量数值亦存在一定差异,这可能是 2 种方法的检测原理差异导致的。ddPCR 方法是基于单分子计数原理,将反应体系分割成数万个微滴,每个微滴独立进行 PCR 反应,从而实现绝对定量,避免了 qPCR 方法对标准曲线和扩增效率的依赖,这在低浓度病毒样本检测中具有明显的优势。30 份田间疑似感染 ToBRFV 的样本中,ddPCR 方法的阳性检出率达 93.3%,检测下限为 1 μL 11.05 拷贝, qPCR 方法的阳性检出率为 76.7%,检测下限为 1 μL 164.66 拷贝,这说明 ddPCR 方法能更灵敏地检测出田间感染 ToBRFV 的样本。基于 2 种检测方

法在性能方面的差异, ddPCR 方法更适合用于 ToBRFV 的早期诊断及载毒量定量、种苗检疫及精准监测, 为 ToBRFV 的防控策略制定、抗病品种选育提供依据。 qPCR 方法虽灵敏度较低, 但操作简便、检测成本低、重复性稳定, 更适合于田间大规模样本筛查及常规监测。 实际应用中, 可利用 qPCR 初筛与 ddPCR 复核的组合检测模式, 降低大规模检测成本, 确保检测准确性, 实现 ToBRFV 的高效、准确和规模化检测。

### 3.2 ddPCR 方法的重复性

在植物病毒检测中, 重复性是评估检测方法可靠性的核心。 本研究中 qPCR 方法对 ToBRFV 检测结果的变异系数为 2.00%~4.50%, 而 ddPCR 方法对 ToBRFV 检测结果的变异系数为 1.40%~8.00%。 这说明 qPCR 方法的检测结果重复性好于 ddPCR 方法。 其原因可能在于 ddPCR 的微滴分割存在一定的随机性。 当模板含量接近单分子水平时, 部分微滴可能因未包裹模板而使扩增结果呈阴性, 导致阳性微滴计数存在一定的波动。 实际检测中, 对低含量样本可增加重复次数, 并结合阳性微滴绝对数量判读结果, 以降低误差。 在不同批次检测结果的重复性方面, 3 名操作人员间隔 7 d 利用 ddPCR 方法对 ToBRFV 检测结果的变异系数为 1.10%~7.30%, 这说明 ddPCR 方法对不同人员不同时间的检测均表现出较高的重复性。 此外, 目前 ddPCR 分析中用的设备有 QX200 微滴式数字 PCR 系统<sup>[19]</sup>、Qiagen QIAcuity One 2-plex 数字 PCR 系统<sup>[20]</sup>、新羿 TD-1 微滴式数字 PCR 系统<sup>[21]</sup>等, 这些系统在病毒检测方面均表现出较好的重复性, 本研究使用的 ddPCR 系统是深圳博瑞生物科技有限公司生产的 S6 型数字 PCR 仪, 在 ToBRFV 检测中同样表现出较好重复性。

### 3.3 ddPCR 引物的特异性

引物特异性是衡量病毒检测方法可靠性的重要指标。 本研究利用 ToBRFV-CqF 和 ToBRFV-CqR 为 ddPCR 引物对 ToBRFV 及其同属的番茄花叶病毒 (ToMV)、烟草花叶病毒 (TMV) 及番茄斑萎病毒 (TSWV) 进行微滴数字 PCR 扩增。 结果发现, ddPCR 引物对 ToBRFV 具有高度特异性, 仅对 ToBRFV 呈现阳性反应, 对番茄花叶病毒、烟草花叶病毒和番茄斑萎病毒均无交叉反应, 这为 ToBRFV 精准诊断提供了有力保障。

综上, 本研究建立的基于 ddPCR 技术的 To-

BRFV 检测方法, 在灵敏度、特异性及田间检测准确性上显著优于传统 qPCR 方法, 为 ToBRFV 的早期诊断、精准防控及种苗检疫提供了高效技术手段。 通过明确 ddPCR 与 qPCR 的应用适配性, 初步构建了“精准检测 + 大规模筛查”的 ToBRFV 综合检测体系, 以抵御 ToBRFV 威胁, 实现番茄及相关蔬菜产业的健康可持续发展。

### 参考文献:

- [1] 邓小芳, 程于真, 杨明霞, 等. 不同栽培方式番茄氮素吸收量及理论施氮量[J]. 西北农业学报, 2024, 33(7): 1299-1307.
- [2] LURIA N, SMITH E, REINGOLD V, et al. A new Israeli *Tobamovirus* isolate infects tomato plants harboring *Tm-2<sup>2</sup>* resistance genes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170429.
- [3] SALEM N, MANSOUR A, CIUFFO M, et al. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(2): 503-506.
- [4] ZHANG S K, GRIFFITHS J S, MARCHAND G, et al. Tomato brown rugose fruit virus: an emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(9): 1262-1277.
- [5] LURIA N, SMITH E, SELA N, et al. A local strain of Paprika mild mottle virus breaks L3 resistance in peppers and is accelerated in Tomato brown rugose fruit virus-infected *Tm-22*-resistant tomatoes[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 280-289.
- [6] OLADOKUN J O, HALABI M H, BARUA P, et al. Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(9): 1579-1586.
- [7] PANNO S, CARUSO A G, BARONE S, et al. Spread of tomato brown rugose fruit virus in Sicily and evaluation of the spatiotemporal dispersion in experimental conditions[J]. *Agronomy*, 2020, 10(6): 834.
- [8] 华明艳, 宋兰芳, 崔少杰, 等. 番茄褐色皱纹果病毒分子检测与基因组部分序列分析[J]. 华北农学报, 2024, 39(3): 179-186.
- [9] GHORBANI A. Genetic analysis of tomato brown rugose fruit virus reveals evolutionary adaptation and codon usage bias patterns[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14: 21281.
- [10] VAN DE VOSSENBERG B T L H, VISSER M, BRUINSMA M, et al. Real-time tracking of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using nextstrain[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0234671.
- [11] ALFARO-FERNÁNDEZ A, CASTILLO P, SANAHUJA E, et al. First report of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Spain [J]. *Plant Disease*, 2021, 105(2): 515.
- [12] YAN Z Y, MA H Y, HAN S L, et al. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China [J]. *Plant Disease*, 2019, 103(11): 2973.
- [13] SARKES A, FU H T, FEINDEL D, et al. Development and eval-

- uation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6):e0230403.
- [14] 田沂民,俞祿珍,易建平,等. 进境番茄种子中番茄褐色皱纹果病毒的检测鉴定[J]. *植物检疫*, 2021, 35(4):35-38.
- [15] KLAP C, LURIA N, SMITH E, et al. Tomato brown rugose fruit virus contributes to enhanced pepino mosaic virus titers in tomato plants[J]. *Viruses*, 2020, 12(8):879.
- [16] 薛超. 植物病毒检测技术研究进展分析[J]. *农业与技术*, 2020, 40(16):48-50.
- [17] 李献锋,于璇,冯黎霞,等. 番茄褐色皱果病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *植物保护*, 2023, 49(6):185-193.
- [18] 王森,陈东亮,黄丛林,等. 基于 PCR 的植物病毒检测技术研究进展[J]. *植物检疫*, 2021, 35(3):1-8.
- [19] TIAN Y M, FEI J, LUO J Y, et al. Development of a reverse-transcription droplet digital PCR method for quantitative detection of Cucumber green mottle mosaic virus[J]. *Heliyon*, 2023, 9(2):e12643.
- [20] LEE H J, KIM H J, KIM S M, et al. Development and application of reverse transcription nanoplate-based digital PCR assay for sensitive and accurate detection of rice black-streaked dwarf virus in cereal crops[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2024, 40(4):408-413.
- [21] WU H J, LIU M, LI W Y, et al. Development and application of droplet digital PCR assay for the detection of watermelon silver mottle virus and melon yellow spot virus[J]. *Horticulturae*, 2024, 10(3):199.
- [22] PANDEY B, MALLIK I, GUDMESTAD N C. Development and application of a real-time reverse-transcription PCR and droplet digital PCR assays for the direct detection of potato mop top virus in soil[J]. *Phytopathology*, 2020, 110(1):58-67.
- [23] 李献锋,胡淑青,魏霜,等. 番茄褐色皱果病毒 SYBR Green I 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. *植物检疫*, 2022, 36(1):25-33.
- [24] PANNO S, RUIZ-RUIZ S, CARUSO A G, et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato brown rugose fruit virus and comparison with other techniques[J]. *PeerJ*, 2019, 7:e7928.
- [25] 丁钊. 马铃薯斑纹片病菌快速检测方法的建立和效果评价[D]. 广州:华南农业大学, 2020.

(责任编辑:石春林)