

苜蓿花叶病毒 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测技术体系的建立与应用



高艳玲^{1,2} 范国权² 程胜群¹ 张威² 邱彩玲² 申宇²

聂先舟³ 白艳菊^{2*} 吕文河^{1*}

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 哈尔滨 150086;

3. 加拿大农业和农业食品部弗雷德里克顿研究发展中心, 新不伦瑞克 弗雷德里克顿 E3B4Z7)

摘要: 为准确检测感染马铃薯核心种苗和种薯的苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV), 以 AMV 马铃薯分离株为阳性材料, 建立 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和基于 EvaGreen 及 TaqMan 探针的反转录实时荧光定量 PCR(reverse transcription real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)检测技术, 比较 3 种方法的检测灵敏度, 并测定不同马铃薯品种 6 种组织和桃蚜 *Myzus persicae*、蓟马体内 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量。结果表明: 建立的 TaqMan 探针 RT-qPCR 法对 RNA 1 和 RNA 2 的检测灵敏度分别为 1.45×10^1 copies/ μ L 和 1.46×10^1 copies/ μ L, 分别是 EvaGreen RT-qPCR 法和 RT-PCR 法的 10 倍; 建立的 TaqMan 探针 RT-qPCR 法对 RNA 3 的检测灵敏度与 EvaGreen RT-qPCR 法相同, 为 1.15×10^2 copies/ μ L, 是 RT-PCR 法的 10 倍。丽薯 15 号 6 种组织中 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量为 $3.04 \times 10^6 \sim 1.67 \times 10^8$ copies/ μ L, 以叶片中病毒平均含量最高; 中薯 21 号 6 种组织中 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量为 $2.94 \times 10^2 \sim 4.78 \times 10^8$ copies/ μ L, 未发现明显分布规律。蓟马体内 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量分别为 $8.64 \times 10^4 \sim 4.76 \times 10^7$ 、 $2.13 \times 10^3 \sim 1.50 \times 10^5$ 和 $8.08 \times 10^3 \sim 4.96 \times 10^5$ copies/ μ L, RNA 1 的含量高于 RNA 2 和 RNA 3。桃蚜体内 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量分别为 $4.71 \times 10^3 \sim 3.44 \times 10^4$ 、 $2.22 \times 10^2 \sim 1.32 \times 10^5$ 和 $5.41 \times 10^1 \sim 8.08 \times 10^2$ copies/ μ L, RNA 3 的含量最低。表明 RT-PCR 法、TaqMan 探针 RT-qPCR 法和 EvaGreen RT-qPCR 法均可有效扩增马铃薯 6 种组织和 2 种昆虫中的 AMV。

关键词: 苜蓿花叶病毒; TaqMan 探针 RT-qPCR; EvaGreen RT-qPCR; RT-PCR; 马铃薯

Development and application of RT-PCR and RT-qPCR for detection of alfalfa mosaic virus

Gao Yanling^{1,2} Fan Guoquan² Cheng Shengqun¹ Zhang Wei² Qiu Cailing² Shen Yu²

Nie Xianzhou³ Bai Yanju^{2*} Lü Wenhe^{1*}

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China; 2. Industrial

Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China;

3. Fredericton Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada,

Fredericton E3B4Z7, New Brunswick, Canada)

Abstract: In order to detect alfalfa mosaic virus (AMV) infecting plantlets *in vitro* and seed potatoes ac-

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-09-P16), 黑龙江省农业科学院院级课题(2018YYF022), 黑龙江省农业科学院农业科技创新跨越工程(HNK2019CX19-06)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: yanjubai@163.com, luwenhe60@163.com

收稿日期: 2021-01-29

curately, the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), EvaGreen and TaqMan probe reverse transcription real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) were developed to detect AMV RNA 1, RNA 2, and RNA 3. The sensitivities of three methods were compared, and the contents of AMV RNA 1, RNA 2, and RNA 3 in six potato tissues of different potato varieties, aphids, and thrips were determined. The sensitivities of TaqMan probe RT-qPCR for RNA 1 and RNA 2 were 1.45×10^1 and 1.46×10^1 copies/ μL recombinant plasmids, respectively, which were ten times those of EvaGreen RT-qPCR and RT-PCR methods. The sensitivity of TaqMan probe RT-qPCR for RNA 3 was the same as that of EvaGreen RT-qPCR, which was 1.15×10^2 copies/ μL , ten times that of RT-PCR. The concentrations of RNA 1, RNA 2, and RNA 3 in six tissues of Lishu 15 were 3.04×10^6 – 1.67×10^8 copies/ μL , with the average virus content highest in the leaves; but in Zhongshu 21, the contents of AMV RNA 1, RNA 2, and RNA 3 were 2.94×10^2 – 4.78×10^8 copies/ μL , and no clear distribution pattern was found. The concentrations of AMV RNA 1, RNA 2, and RNA 3 in thrips were 8.64×10^4 – 4.76×10^7 , 2.13×10^3 – 1.50×10^5 , and 8.08×10^3 – 4.96×10^5 copies/ μL , respectively, with the content of RNA 1 being relatively higher than that of RNA 2 and RNA 3. The concentrations of AMV RNA 1, RNA 2, and RNA 3 in *Myzus persicae* were 4.71×10^3 – 3.44×10^4 , 2.22×10^2 – 1.32×10^5 , and 5.41×10^1 – 8.08×10^2 copies/ μL , respectively, with RNA 3 content lowest. These results indicated that AMV in six potato tissues and two insect species could be amplified effectively by RT-PCR, TaqMan probe and EvaGreen RT-qPCR.

Key words: alfalfa mosaic virus; TaqMan probe RT-qPCR; EvaGreen RT-qPCR; RT-PCR; potato

目前,马铃薯为我国第4大粮食作物,种植面积(4 218 188 hm^2)和总产量(78 236 596 000 kg)居世界首位,但平均单产仅为18 547 kg/hm^2 ,为荷兰的43.46%、美国的36.52%(FAOSTAT, 2020)。其产量与种薯质量密切相关,而病毒是降低种薯质量的关键因素之一。迄今为止,危害马铃薯的病毒超过40种,其中苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)在亚洲(Komuro et al., 1964; Park et al., 2018)、欧洲(Gibbs & Tinsley, 1961; Parrella et al., 2000)、北美洲(Rahman & Peadar 1993; Shah et al., 2006)、南美洲(Trucco et al., 2014)、大洋洲(Hajimorad & Francki, 1988)和非洲(Abdel Aleem et al., 2018)广泛分布。20世纪70到80年代,AMV在我国内蒙古、黑龙江、山东和甘肃等省区马铃薯田均有发生(张鹤龄和郭素华, 1983; 李芝芳, 2004),之后在辣椒、番茄(田如燕等, 1989; 冯兰香和杨翠荣, 1991)、三叶草(魏宁生和李毅, 1987; 金磊磊等, 2015)、苜蓿(文朝慧和南志标, 2015; 张芯伪, 2016)、薄荷草(Li et al., 2019)、绞股蓝(Song et al., 2019)和田间杂草乌藜莓、爵床、婆婆纳(Gao et al., 2020)上均有发生。

AMV属于雀麦花叶病毒科 *Bromoviridae* 苜蓿花叶病毒属 *Alfamovirus*, 为正义单链RNA病毒,具有三分体基因组和1个亚基因组, RNA 1长3 643 nt, RNA 2长2 593 nt, RNA 3长2 038 nt(Parrella et al.,

2010)。AMV通过自然侵染和人工接种可危害70科600种植物(Bol, 2008),马铃薯为AMV天然寄主之一,感病后叶片表现亮黄色花叶或斑驳,减产约20%(Porter, 1931),敏感品种块茎内部产生褐色坏死(Nie et al., 2020)。AMV可通过15种蚜虫以非持久性方式传播(Bol, 2003),美国大豆上AMV的发生率高主要是由于大豆蚜 *Aphis glycines* 带毒率高(Hill et al., 2001; Clark & Perry, 2002; Wang & Ghabrial, 2002)。澳大利亚豆科牧草上AMV的发生与苜蓿斑蚜 *Therioaphis trifolii*、蓝苜蓿蚜 *Acyrtosiphon kondoi* 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 种群引入有关(Hajimorad & Francki, 1988)。AMV亦可通过马铃薯种薯(张鹤龄和郭素华, 1983; Nie et al., 2020)和苜蓿(文朝慧等, 2018)、大豆(He et al., 2010)等无性繁殖材料或种子传播。由于苜蓿是多年生植物,当马铃薯田靠近苜蓿田或前茬为苜蓿时,马铃薯易感染AMV并出现较高的发病率(张鹤龄和郭素华, 1983)。Abdalla et al. (2020)在苜蓿田附近的昆诺藜、田旋花和黄花菊等7种田间杂草和其他栽培作物中均检测到AMV,认为在不同作物生长季间,AMV通过虫媒介体等在苜蓿、杂草和其他作物之间传播,促进了AMV的传播和流行。

迄今为止,国际上通用的马铃薯病毒病防治方法是对种薯进行全程质量检测,生产并种植脱毒种薯(白艳菊等, 2006; Halterman et al., 2012; 申宇等,

2014), AMV 为英国、欧盟国家和中国等制定的马铃薯种苗标准中必须检测的参数。目前 AMV 检测技术主要有指示植物法(Panter et al., 2012)、双抗体夹心酶联免疫吸附测定(double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)法(Hajimorad & Francki, 1988; He et al., 2011)、核酸斑点杂交法(Alhudaib, 2019)、逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 AMV RNA 3(Xu & Nie, 2006)及三重 RT-PCR 法检测 AMV RNA 2、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)等(Abdel Aleem et al., 2018)。其中, ELISA 法和核酸斑点杂交法适用于大批量样品检测, RT-PCR 法灵敏度较高, 适用于检测病毒浓度较低的样品(Alhudaib, 2019)。实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)和反转录实时荧光定量 PCR(reverse transcription real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)技术自发展以来, 由于其灵敏、准确、快速等特点, 已广泛应用于感染人类、动物(黄小武等, 2020)和植物的微生物检测工作中, 包括病毒(王瑛丽等, 2019)、类病毒(郝娜娜等, 2020)、细菌(卢美欢等, 2019)、真菌(雷翠云等, 2019)、植原体(王柱华等, 2021)和线虫(宋志强等, 2013)等, 也可用于检测介体蚜虫体内的植物病毒(刘永清等, 2010; 韩树鑫等, 2016)。目前应用较广的是基于 TaqMan 探针和 SYBR Green 或 EvaGreen 等荧光染料的 RT-qPCR 法, 如采用染料 RT-qPCR 法检测柑橘黄化脉明病毒(citrus yellow vein clearing virus, CYVCV)(宋震等, 2017)和采用 SYBR Green qPCR 法检测番茄煤污假尾孢 *Pseudocercospora fuligena*(康华军等, 2019)时的灵敏度分别是普通 PCR 法的 100 倍和 1 000 倍。本研究拟建立针对 AMV 的 EvaGreen RT-qPCR、TaqMan 探针 RT-qPCR 和 RT-PCR 检测技术, 比较三者的检测灵敏度及实际应用效果, 以期对种薯产业待茎尖剥离的候选块茎、种苗和各级种薯的检测与定量提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 AMV 毒源、健康植物及昆虫: 感 AMV 阳性马铃薯植株 GS 252、GS 367、GS 515、GS 516、HLJ 430 和 NX 7 采自黑龙江省、甘肃省和宁夏回族自治区马铃薯田, 健康马铃薯试管苗 G 0 由黑龙江省农业科学院经济作物研究所保存并提供。3 头桃

蚜 *Myzus persicae* 和 5 头蓟马采自感染 AMV 的马铃薯植株。马铃薯品种丽薯 15 号和中薯 21 号的原原种购于马铃薯种薯生产企业。马铃薯感 AMV 阳性植株 GS 515 种植于温室中备用, 丽薯 15 号和中薯 21 号原原种与其隔离种植, 每个品种 6 株, 待株高长至 15~20 cm 时供试。温室内温度 18~24℃、光照 16 h/黑暗 8 h。

试剂及仪器: Taq DNA 聚合酶、2×PCR Premix、RNA 酶抑制剂、dNTP、随机引物 pd(N)9、100 bp DNA Ladder, 宝生物工程(大连)有限公司; M-MLV 反转录酶, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; TRIzol 试剂, 美国 Invitrogen 公司; 质粒小提试剂盒、无 DNA/RNA 酶去离子水, 天根生化科技(北京)有限公司; EvaGreen 核酸染料, 美国 Biotium 公司; pEASY-T 5 Zero 克隆试剂盒, 北京全式金生工技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。Roche Light-Cycler® 480 实时荧光 PCR 仪, 美国罗氏生物技术公司; NANODROP 1 000 紫外分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; TP 600 PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司; DYY-2C 型双稳定时电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; AlphaImager HP 凝胶成像系统, 美国 ProteinSimple 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物、探针设计与筛选

从 NCBI 网站 GenBank 数据库中下载 AMV 的 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 全序列, 应用 BioEdit 7.1.3 软件分别比对后选择保守区域, 依据 AMV Manfredi 分离株 RNA 1(KC881008)、RNA 2(KC881009)和 RNA 3(KC881010)序列为模板, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的 RT-PCR、EvaGreen RT-qPCR 引物和 TaqMan 探针 RT-qPCR 引物以及探针(表 1), 所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取与 RT-PCR、RT-qPCR 检测体系建立

切取阴性对照健康马铃薯试管苗 G 0 的茎叶组织和感染 AMV 的阳性马铃薯植株 GS 515 及 HLJ 430 的叶片组织各 100 mg, 置于 -20℃ 预冷研钵中, 加入液氮研磨后迅速转入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 按照说明书提取植物总 RNA, 溶于 30 μL 无 DNA/RNA 酶去离子水中。并将无 DNA/RNA 酶去离子水设为空白对照。取 4 μL 无 DNA/RNA 酶去离子水和 4 μL 植物总 RNA, 分别加入 1 μL 随机引物 pd(N)9、用无 DNA/RNA 酶去离子水补至 10 μL, 70℃ 预变性 5 min, 冰上放置 2 min。

依次加入 5×反转录缓冲液 5 μL、10 mmol/L dNTP 1.25 μL、40 U/μL RNA 酶抑制剂 0.5 μL、200 U/μL M-MLV 反转录酶 1 μL、无 DNA/RNA 酶去离子水 7.25 μL。反转录程序：37℃ 延伸 1 h，70℃ 变性 10 min，4℃ 冷却 2 min。将反转录合成的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系：2×PCR Premix 12.5 μL、10 μmol/L 上下游引物(表 1)各 0.5 μL、cDNA 2 μL，用无 DNA/RNA 酶去离子水补足至 25 μL。反应程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 20 s，52℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 30 s，共 35 个循环；72℃ 终延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，凝胶成像系统观察样品是否出现目的条带，如果出现目的条带说明样品中含有 AMV，未出现则说明样品中不含 AMV。

表 1 苜蓿花叶病毒 RT-PCR、EvaGreen RT-qPCR 引物和 TaqMan 探针 RT-qPCR 法引物和探针
Table 1 Primers for RT-PCR and EvaGreen RT-qPCR, and primers and probes for TaqMan probe RT-qPCR of alfalfa mosaic virus

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物长度 Primer length/bp	引物位置 Primer location	片段长度 Amplicon length/bp	熔解温度 Melting tempera- ture/℃	检测方法 Detection method
1-970 F	CGAATCGAACGTAAGCAA	18	RNA 1, 970-987	321	77.1	RT-PCR, EvaGreen RT-qPCR
1-1290 R	ATGATTTCGTTGAAGAAGATAA	21	RNA 1, 1 270-1 290			
2-812 F	ATGAAGCCGTCATATCAGGT	20	RNA 2, 812-831	243	85.2	RT-PCR, EvaGreen RT-qPCR
2-1054 R	TCAGATCGATTCGACATGGA	20	RNA 2, 1 035-1 054			
3-1749 F	TACCGATTCAACGAAGTTT	19	RNA 3, 1 749-1 767	209	/	EvaGreen RT-qPCR
3-1957 R	TATCAGGAGCGAATAGGACT	20	RNA 3, 1 938-1 957			
3-1522 F	GTCTCACTGATGACGTGACG	20	RNA 3, 1 522-1 541	108	86.0	TaqMan 探针 RT-qPCR
3-1629 R	CAAACCCGAACCTTCTCATT	19	RNA 3, 1 611-1 629			
1-970 F	CGAATCGAACGTAAGCAA	18	RNA 1, 970-987	133	/	TaqMan 探针 RT-qPCR
P 1	5'-CY5-TTTGTCCCCAAGATGCCACAYTC- C-3'-BHQ-X	25	RNA 1, 1 033-1 057			
1-1102 R	CCATTGTGCTTTGACTCTATT	22	RNA 1, 1 081-1 102			TaqMan 探针 RT-qPCR
2-812 F	ATGAAGCCGTCATATCAGGT	20	RNA 2, 812-831	195	/	
P 2	5'-HEX-TCAGGTAATGATTGGATGACGTT- GG-3'-BHQ1	24	RNA 2, 826-851			TaqMan 探针 RT-qPCR
2-1006 R	CAACCCATTCTTGAAAATACTT	22	RNA 2, 985-1 006			
3-1749 F	TACCGATTCAACGAAGTTT	19	RNA 3, 1 749-1 767	209	/	TaqMan 探针 RT-qPCR
P 3	5'-6-FAM-AGCAGGGCCCTCCGCAG-3'-BHQ1	18	RNA 3, 1 793-1 811			
3-1957 R	TATCAGGAGCGAATAGGACT	20	RNA 3, 1 938-1 957			TaqMan probe RT-qPCR

引物和探针参考序列为 AMV 分离株 Manfredi 的 RNA 1(KC881008)、RNA 2(KC881009)和 RNA 3(KC881010)。The reference sequences of primers and probes were RNA 1 (KC881008), RNA 2 (KC881009) and RNA 3 (KC881010) of Manfredi isolates of AMV.

20 μL EvaGreen qPCR 反应体系：10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 2 μL、2.5 mmol/L dNTP 0.8 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL、EvaGreen 1 μL、5 U/μL Taq 酶 0.12 μL、cDNA 2 μL，用无 DNA/RNA 酶去离子水补足至 20 μL。反应程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 25 s，52℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，采集荧光信号；45 个循环，60~97℃ 分析熔解曲线，40℃ 冷却。观察样品在目标熔解温度是否出现特异熔解峰，如果出现说明样品中含有 AMV，未出现则说明样品中不含 AMV。

20 μL TaqMan 探针 qPCR 反应体系：10×PCR

缓冲液(含 Mg²⁺) 2 μL、2.5 mmol/L dNTP 0.8 μL、10 μmol/L 上下游引物和探针各 0.4 μL、5 U/μL Taq 酶 0.12 μL、cDNA 2 μL，用无 DNA/RNA 酶去离子水补足至 20 μL。反应程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 25 s，52℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，采集荧光信号；45 个循环，40℃ 冷却。观察样品是否出现扩增曲线，如果出现说明样品中含有 AMV，未出现则说明样品中不含 AMV。

1.2.3 标准品制备和 3 种方法检测灵敏度测定

制备 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 重组质粒标准品以测定 3 种方法检测灵敏度并建立 EvaGreen

RT-qPCR法和TaqMan探针RT-qPCR法的标准曲线。应用引物组 1-970 F/1-1290 R、2-812 F/2-1054 R、3-1749 F/3-1957 R(RNA 3的RT-PCR法和TaqMan探针RT-qPCR法)和3-1522 F/3-1629 R(RNA 3的EvaGreen RT-qPCR法)对AMV阳性样品GS 515进行RT-PCR扩增,得到RNA 1、RNA 2和2个RNA 3的扩增产物,分别与pEASY-T 5 Zero载体连接,转化到大肠杆菌*Escherichia coli* Trans 1-T1感受态细胞中,应用RT-PCR法鉴定阳性克隆子,利用质粒小提试剂盒提取重组质粒并测序,采用紫外分光光度计测定各重组质粒浓度,计算单位体积重组质粒拷贝数。质粒拷贝数=6.02×10²³×质粒浓度/(载体长度+片段长度)×660,式中6.02×10²³为阿佛伽德罗常数,使用的克隆载体碱基对数为3 955 bp。获得的RNA 1和RNA 2重组质粒拷贝数分别为1.45×10¹⁰ copies/μL、1.46×10¹⁰ copies/μL, RNA 3的2个重组质粒浓度均用无DNA/RNA酶去离子水调整到1.15×10¹⁰ copies/μL。重组质粒按照拷贝数进行10倍梯度稀释作为标准品,分别获得1.45×10⁰~1.45×10⁹ copies/μL的RNA 1、1.46×10⁰~1.46×10⁹ copies/μL的RNA 2和1.15×10⁰~1.15×10⁹ copies/μL的RNA 3的梯度稀释液,分别进行EvaGreen qPCR、TaqMan探针qPCR和PCR扩增,以无DNA/RNA酶去离子水为空白对照,反应体系和程序同1.2.2,每个标准品和空白对照3次重复,以测试3种方法的检测灵敏度。

1.2.4 2种RT-qPCR法标准曲线的建立

为建立EvaGreen RT-qPCR法和TaqMan探针RT-qPCR法的标准曲线,应用浓度分别为1.45×10¹~1.45×10⁹ copies/μL、1.46×10¹~1.46×10⁹ copies/μL、1.15×10¹~1.15×10⁹ copies/μL的AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3重组质粒标准品进行EvaGreen qPCR和TaqMan探针qPCR扩增,反应体系和程序同1.2.2,每个标准品3次重复。以拷贝数对数值为x轴,循环阈值(cycle threshold, Ct)为y轴,分别构建AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的EvaGreen RT-qPCR法和TaqMan探针RT-qPCR法标准曲线。

1.2.5 所建3种方法对田间采集样品的检测效果

为测定马铃薯组织中的AMV含量,在3株(编号为35-1、35-2和35-3)马铃薯品种丽薯15号和3株(编号为50-1、50-2和50-3)中薯21号株高15~20 cm时,选取植株上部2片叶片,撒上21 μm金刚砂。取感染AMV的叶片置于研钵中,按照植物叶片:磷酸缓冲液质量体积比1:10的比例加入磷酸盐缓冲液,研磨后转入EP管中,2 000 r/min离心2 min,获得的

上清液即为病毒溶液,用移液器吸取150 μL病毒溶液放在撒有金刚砂的叶片上,戴一次性手套用手指摩擦3~5次,10 min后清水冲洗叶片。每个品种设置3株作为阴性对照,仅接种磷酸盐缓冲液。接种后植株放置在温度18~24℃、光照16 h/黑暗8 h的温室中培养,90 d后采集接种AMV马铃薯植株的叶片、叶柄、茎、匍匐茎、块茎和根各100 mg,应用TRIzol法提取植物总RNA,应用紫外分光光度计测定RNA浓度,用无DNA/RNA酶去离子水稀释至100 ng/μL。应用TaqMan探针RT-qPCR法测定马铃薯6种组织中AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的含量,每个样品3次重复,反应体系和程序同1.2.2。

为测定单头蓟马和桃蚜体内的AMV含量,将采集的3头桃蚜和5头蓟马分别置于1.5 mL EP管中,加入100 μL TRIzol试剂,用玻璃研棒在离心管内分别将蚜虫和蓟马虫体研碎,按照TRIzol试剂说明书进行操作,最后用10 μL无DNA/RNA酶去离子水溶解RNA,应用紫外分光光度计测定RNA浓度。应用TaqMan探针RT-qPCR法测定AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的含量,每个样品3次重复,反应体系和程序同1.2.2。

为验证RT-PCR、EvaGreen RT-qPCR和TaqMan探针RT-qPCR法检测体系的适用性,应用TRIzol法按照说明书提取采自甘肃省、黑龙江省和宁夏回族自治区马铃薯田的6株感AMV阳性马铃薯植株的总RNA,提取方法同1.2.2,分别应用上述所建3种方法进行检测,反应体系和程序同1.2.2。

2 结果与分析

2.1 AMV RT-PCR和RT-qPCR检测体系的建立

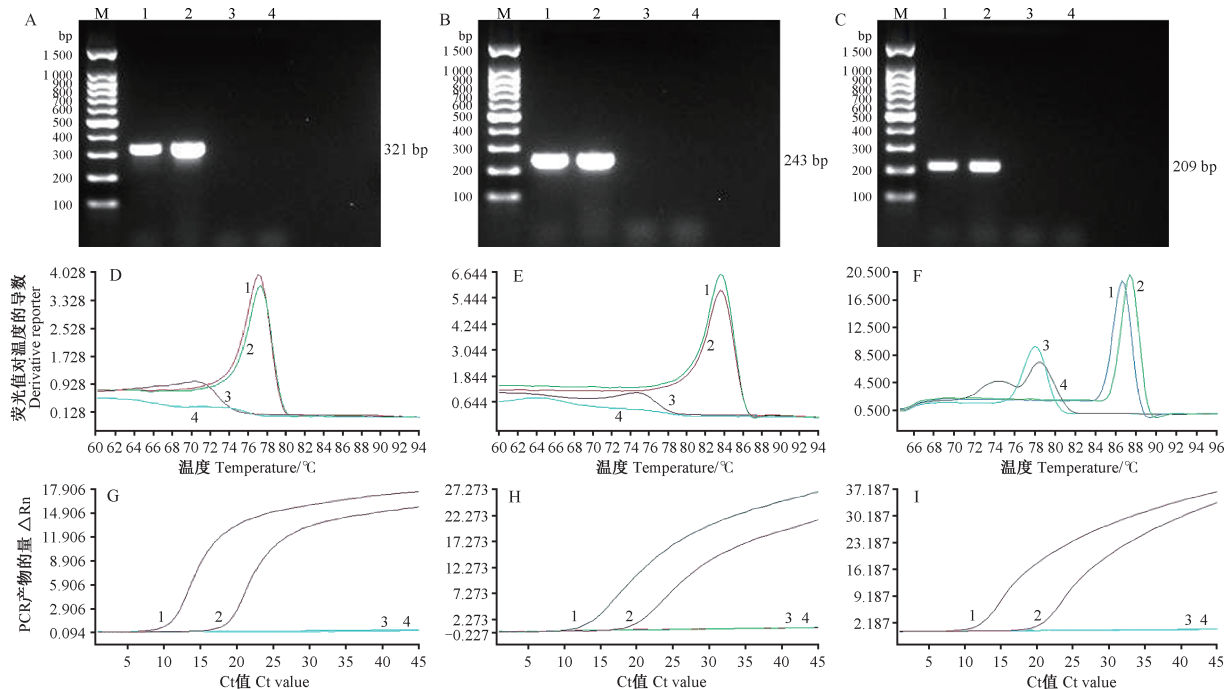
RT-PCR检测体系:利用引物组1-970 F/1-1290 R、2-812 F/2-1054 R和3-1749 F/3-1957 R分别扩增AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3后,阳性样品GS 515和HLJ 430中的扩增片段长度均依次为321 bp(图1-A)、243 bp(图1-B)和209 bp(图1-C),长度与目的片段相符,阴性对照马铃薯健康试管苗G 0样品和空白对照未扩增出目的条带,表明所建RT-PCR检测体系特异性良好。

EvaGreen RT-qPCR检测体系:利用引物组1-970 F/1-1290 R、2-812 F/2-1054 R和3-1522 F/3-1629 R扩增AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3后,通过熔解曲线分析发现,阳性样品GS 515和HLJ 430的RNA 1、RNA 2目的片段熔解温度均分别为77℃(图1-D)和84℃(图1-E);阳性样品GS 515和HLJ

430的RNA 3目的片段熔解温度则不同,分别为86℃和87℃(图1-F)。阴性对照和空白对照在上述熔解温度未出现熔解峰,表明所建EvaGreen RT-qPCR检测体系特异性良好。

TaqMan 探针 RT-qPCR 检测体系:利用引物组1-970 F/1-1102 R和探针P1、引物组2-812 F/2-1006 R

和探针P2、引物组3-1749 F/3-1957 R和探针P3的RT-qPCR扩增结果显示,阳性样品GS 515和HLJ 430的RNA 1(图1-G)、RNA 2(图1-H)和RNA 3(图1-I)均出现扩增曲线,而阴性对照和空白对照未出现扩增曲线,表明所建TaqMan 探针 RT-qPCR 检测体系特异性良好。



M: 100 bp DNA ladder; 1: GS 515; 2: HLJ 430; 3: 阴性对照; 4: 空白对照。M: 100 bp DNA ladder; 1: GS 515; 2: HLJ 430; 3: negative control; 4: blank control.

图1 苜蓿花叶病毒RNA 1、RNA 2和RNA 3的RT-PCR法(A~C)、EvaGreen RT-qPCR法(D~F)和TaqMan 探针RT-qPCR法(G~I)检测结果

Fig. 1 RT-PCR (A~C), EvaGreen RT-qPCR (D~F), and TaqMan probe RT-qPCR (G~I) detection results of alfalfa mosaic virus RNA 1, RNA 2, and RNA 3

2.2 所建3种方法的检测灵敏度

对AMV的RNA 1、RNA 2和RNA 3重组质粒标准品进行PCR扩增得到321、243和209 bp目的条带的最低浓度依次为 1.45×10^2 copies/ μ L(图2-A)、 1.46×10^2 copies/ μ L(图2-B)和 1.15×10^3 copies/ μ L(图2-C),为RT-PCR法的最低检出限。

对AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的重组质粒标准品进行EvaGreen qPCR扩增,3次重复均得到特异性熔解峰最低浓度依次为 1.45×10^2 copies/ μ L(图2-D)、 1.46×10^2 copies/ μ L(图2-E)和 1.15×10^2 copies/ μ L(图2-F),为EvaGreen RT-qPCR法的最低检出限。

对AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的重组质粒标准品进行TaqMan 探针 qPCR扩增后,3次重复得到扩增曲线的最低浓度依次为 1.45×10^1 copies/ μ L(图2-G)、 1.46×10^1 copies/ μ L(图2-H)和 1.15×10^2 copies/ μ L

(图2-I),为TaqMan 探针 RT-qPCR法的最低检出限。此外,对RNA 2重组质粒标准品 1.46×10^0 copies/ μ L以及RNA 3重组质粒标准品 1.15×10^1 copies/ μ L扩增后,3个重复中有2个得到扩增曲线,表明RNA 2和RNA 3存在66.67%的可能性分别扩增到 1.46×10^0 copies/ μ L和 1.15×10^1 copies/ μ L的重组质粒。

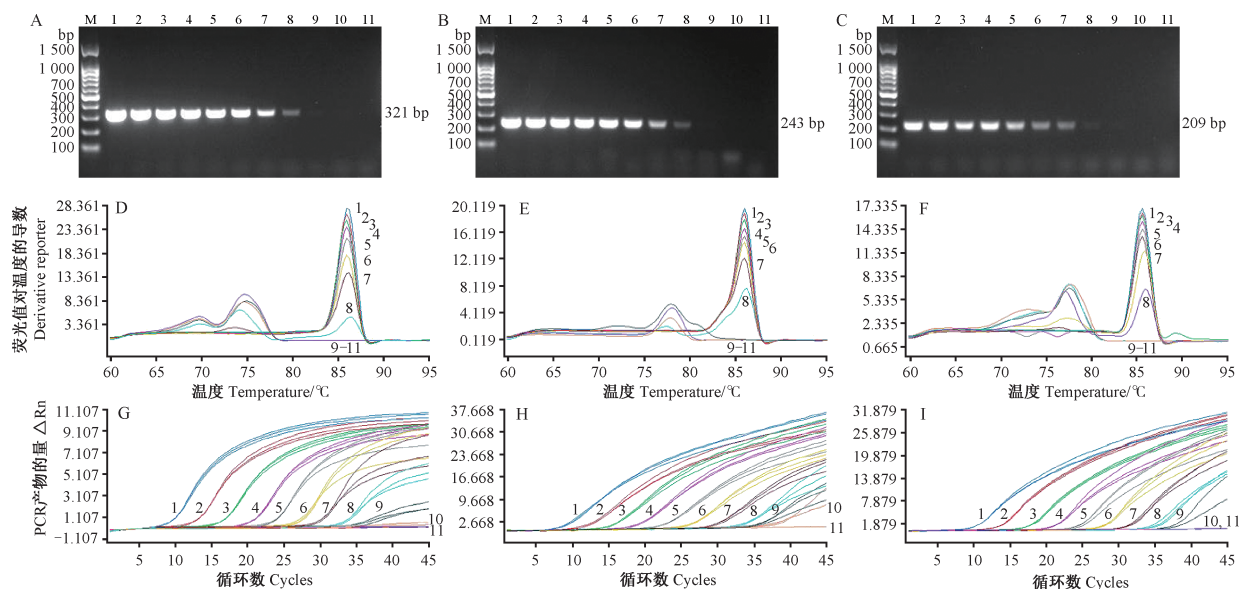
2.3 2种RT-qPCR法标准曲线的建立

采用EvaGreen RT-qPCR法建立AMV的标准曲线。当AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的重组质粒浓度分别在 $1.45 \times 10^3 \sim 1.45 \times 10^9$ copies/ μ L、 $1.46 \times 10^3 \sim 1.46 \times 10^9$ copies/ μ L和 $1.15 \times 10^4 \sim 1.15 \times 10^9$ copies/ μ L之间时,Ct值与重组质粒拷贝数对数之间呈现良好的线性关系,其中RNA 1的标准曲线为 $y = -3.816x + 41.93$, $R^2 = 0.993$ (图3-A);RNA 2的标准曲线为 $y = -3.786x + 41.41$, $R^2 = 0.998$ (图3-B);RNA 3的标准

曲线为 $y=-3.752x+41.54$, $R^2=0.998$ (图 3-C)。

采用 TaqMan 探针 RT-qPCR 法建立 AMV 的标准曲线。当 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 重组质粒分别在 $1.45 \times 10^1 \sim 1.45 \times 10^9$ copies/ μL 、 $1.46 \times 10^1 \sim 1.46 \times 10^9$ copies/ μL 和 $1.15 \times 10^1 \sim 1.15 \times 10^9$ copies/ μL 之间时, Ct 值与 RNA 重组质粒拷贝数对数之间呈现良好

的线性关系,其中 RNA 1 的标准曲线为 $y=-3.566x+40.160$, $R^2=0.993$ (图 3-D); RNA 2 的标准曲线为 $y=-3.490x+40.28$, $R^2=0.998$ (图 3-E); RNA 3 的标准曲线为 $y=-3.692x+42.36$, $R^2=0.993$ (图 3-F)。表明 TaqMan 探针 RT-qPCR 法与 EvaGreen RT-qPCR 法相比更适用于测定病毒含量较低的样品。



M: 100 bp DNA ladder; A、D、G: 1~10 分别为 1.45×10^9 、 1.45×10^8 、 1.45×10^7 、 1.45×10^6 、 1.45×10^5 、 1.45×10^4 、 1.45×10^3 、 1.45×10^2 、 1.45×10^1 、 1.45×10^0 copies/ μL 质粒; B、E、H: 1~10 分别为 1.46×10^9 、 1.46×10^8 、 1.46×10^7 、 1.46×10^6 、 1.46×10^5 、 1.46×10^4 、 1.46×10^3 、 1.46×10^2 、 1.46×10^1 、 1.46×10^0 copies/ μL 质粒; C、F、I: 1~10 分别为 1.15×10^9 、 1.15×10^8 、 1.15×10^7 、 1.15×10^6 、 1.15×10^5 、 1.15×10^4 、 1.15×10^3 、 1.15×10^2 、 1.15×10^1 、 1.15×10^0 copies/ μL 质粒; 11: 空白对照。M: 100 bp DNA ladder; A、D、G: 1~10 分别为 1.45×10^9 、 1.45×10^8 、 1.45×10^7 、 1.45×10^6 、 1.45×10^5 、 1.45×10^4 、 1.45×10^3 、 1.45×10^2 、 1.45×10^1 、 1.45×10^0 copies/ μL 质粒, respectively; B、E、H: 1~10 分别为 1.46×10^9 、 1.46×10^8 、 1.46×10^7 、 1.46×10^6 、 1.46×10^5 、 1.46×10^4 、 1.46×10^3 、 1.46×10^2 、 1.46×10^1 、 1.46×10^0 copies/ μL 质粒, respectively; C、F、I: 1~10 分别为 1.15×10^9 、 1.15×10^8 、 1.15×10^7 、 1.15×10^6 、 1.15×10^5 、 1.15×10^4 、 1.15×10^3 、 1.15×10^2 、 1.15×10^1 、 1.15×10^0 copies/ μL 质粒, respectively; 11: blank control.

图2 苜蓿花叶病毒 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的 RT-PCR 法(A~C)、EvaGreen RT-qPCR 法(D~F)和 TaqMan 探针 RT-qPCR 法(G~I)检测灵敏度

Fig. 2 Detection sensitivities of alfalfa mosaic virus RNA 1, RNA 2, and RNA 3 using RT-PCR (A~C), EvaGreen RT-qPCR (D~F), and TaqMan probe RT-qPCR (G~I)

2.4 所建3种检测方法的实际应用效果

3株丽薯15号(编号为35-1、35-2和35-3)和3株中薯21号(编号为50-1、50-2和50-3)的叶片、叶柄、茎、匍匐茎、块茎和根中 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量相差不大(图4)。3株丽薯15号6种组织中 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 含量在 $3.04 \times 10^6 \sim 1.67 \times 10^8$ copies/ μL 之间,其中叶片中为 $1.13 \times 10^7 \sim 1.67 \times 10^8$ copies/ μL ,叶柄中为 $5.21 \times 10^6 \sim 5.58 \times 10^7$ copies/ μL ,茎中为 $9.35 \times 10^6 \sim 7.67 \times 10^7$ copies/ μL ,匍匐茎中为 $3.04 \times 10^6 \sim 1.17 \times 10^8$ copies/ μL ,根中为 $9.00 \times 10^6 \sim 1.12 \times 10^8$ copies/ μL ,休眠块茎中为 $3.07 \times 10^6 \sim 7.30 \times 10^7$ copies/ μL 。3株马铃薯不同组织中 AMV

平均含量由高到低依次为叶片(7.98×10^7 copies/ μL)、匍匐茎(4.10×10^7 copies/ μL)、根(4.06×10^7 copies/ μL)、茎(3.61×10^7 copies/ μL)、块茎(3.12×10^7 copies/ μL)和叶柄(2.39×10^7 copies/ μL)。

马铃薯品种中薯21号3株植株6种组织中 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的含量为 $2.94 \times 10^3 \sim 4.78 \times 10^8$ copies/ μL ,差异较大。其中马铃薯植株50-1的6种组织中 AMV 含量为 $1.21 \times 10^6 \sim 4.78 \times 10^8$ copies/ μL ;但植株50-2块茎中 AMV 的含量仅为 $2.94 \sim 4.54 \times 10^2$ copies/ μL ,其他5种组织中 AMV 的含量在 $1.23 \times 10^7 \sim 3.04 \times 10^8$ copies/ μL 之间,叶片中 AMV 含量是块茎中 AMV 含量的 27 000 倍以上;而植株50-3则相

反,块茎中 AMV 的含量最高,为 $1.01 \times 10^8 \sim 2.10 \times 10^8$ copies/ μL ,其他 5 种组织中 AMV 的含量仅为 $2.07 \times 10^3 \sim 1.08 \times 10^5$ copies/ μL ,块茎中 AMV 含量是其他 5 种组织中 AMV 含量的 935 倍以上。

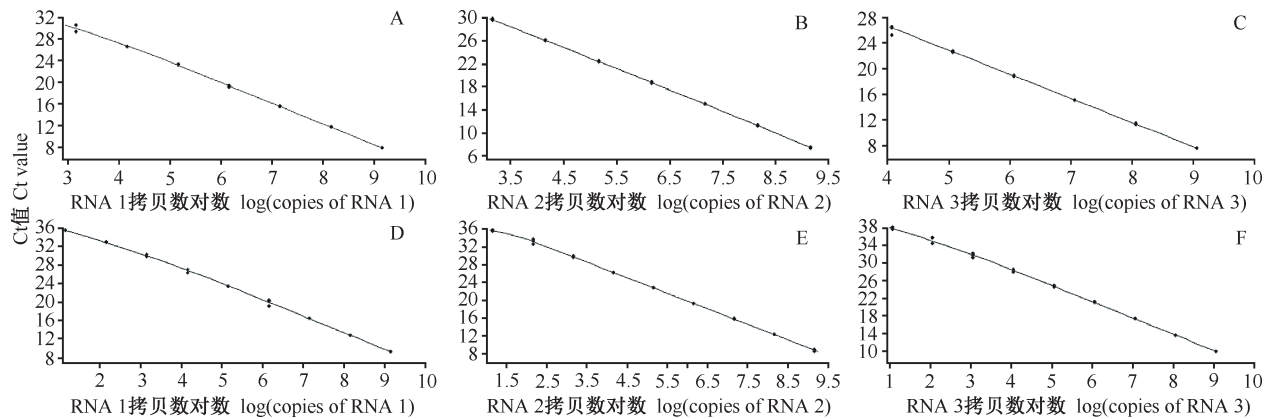


图3 苜蓿花叶病毒 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的 EvaGreen RT-qPCR 法(A~C)和 TaqMan 探针 RT-qPCR 法(D~F)标准曲线

Fig. 3 Standard curves for detection of alfalfa mosaic virus RNA 1, RNA 2, and RNA 3 using EvaGreen RT-qPCR (A~C) and TaqMan probe RT-qPCR (D~F) methods

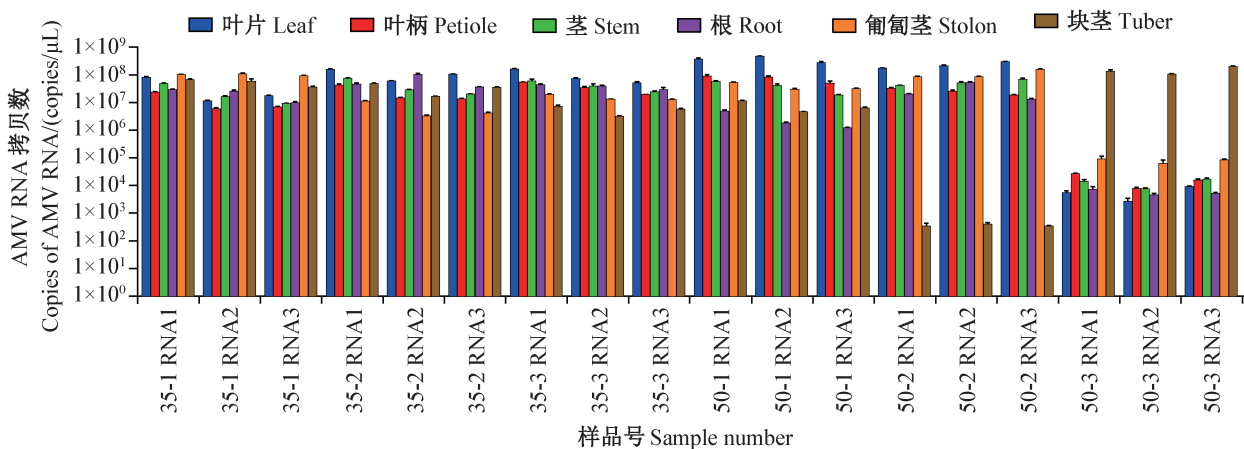


图4 苜蓿花叶病毒 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 在 2 个马铃薯品种 6 种组织中的含量

Fig. 4 Concentrations of alfalfa mosaic virus RNA 1, RNA 2, and RNA 3 in six samples from two potato varieties

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。35-1、35-2、35-3: 马铃薯品种丽薯 15 号 3 个样品; 50-1、50-2、50-3: 马铃薯品种中薯 21 号 3 个样品。Data are mean $\pm$ SD. 35-1, 35-2, 35-3: Three samples of potato variety Lishu 15; 50-1, 50-2, 50-3: three samples of potato variety Zhongshu 21.

5 头蓟马和 2 头蚜虫体内均含有 AMV, 蚜虫体内 AMV 的含量为 $5.41 \times 10^1 \sim 1.32 \times 10^5$ copies/ μL , 其中 RNA 1 和 RNA 2 的含量分别为 $4.71 \times 10^3 \sim 3.44 \times 10^4$ copies/ μL 和 $2.22 \times 10^2 \sim 1.32 \times 10^5$ copies/ μL , RNA 3 含量最低, 为 $5.41 \times 10^1 \sim 8.08 \times 10^2$ copies/ μL ; 蓟马体内 AMV 的含量为 $2.13 \times 10^3 \sim 4.76 \times 10^7$ copies/ μL , 其中 RNA 1 的含量最高, 为 $8.64 \times 10^4 \sim 4.76 \times 10^7$ copies/ μL , RNA 2 和 RNA 3 的含量较低, 分别为 $2.13 \times 10^3 \sim 1.50 \times 10^5$ copies/ μL 和 $8.08 \times 10^3 \sim 4.96 \times 10^5$ copies/ μL (图 5)。

采自甘肃省、宁夏回族自治区和黑龙江省的 6 个感染 AMV 马铃薯样品经 RT-PCR 法检测均得到特异性条带, 经 EvaGreen RT-qPCR 法检测均得到特异

性溶解峰, 经 TaqMan 探针 RT-qPCR 法检测均得到扩增曲线, 表明所建 3 种方法对 3 个来源的 AMV 分离株均可有效检出。

3 讨论

AMV、马铃薯奥古巴花叶病毒 (potato aucuba mosaic virus, PAMV) 和马铃薯帚顶病毒 (potato mop-top virus, PMTV) 侵染马铃薯均可引起叶片黄斑花叶症状, 而且 AMV 引起的植株症状会随气温升高而减轻乃至消失, 当气候条件适合时症状再次出现 (Gibbs & Tinsley, 1961), 此外, 应用 ELISA 法检测大豆 AMV 发生情况时发现检测结果与植株症

状关系不大(He et al., 2011)。因此,不宜依据马铃薯发病症状目测 AMV 发生情况,应建立准确、灵敏、快速的分子检测技术,这对于马铃薯核心种苗、各级种薯中 AMV 的检测非常重要。

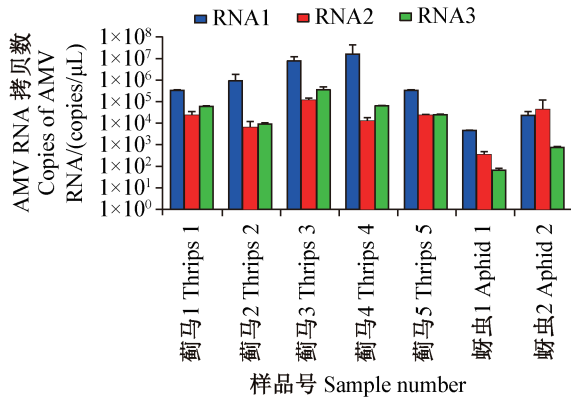


图5 苜蓿花叶病毒 RNA 1、RNA 2 及 RNA 3 在蚜虫和蓟马体内的含量

Fig. 5 Concentrations of alfalfa mosaic virus RNA1, RNA 2, and RNA 3 in aphids and thrips

图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

TaqMan 探针 RT-qPCR 法需设计引物和探针,而染料 RT-qPCR 法和 RT-PCR 法仅需设计引物。在方法选择上,首先要考虑病毒核酸序列的变异程度,核酸序列变异较大的病毒,染料 RT-qPCR 和 RT-PCR 检测体系可减少探针这个变量,降低探针区域核酸序列变异引起的漏检。对于核酸序列变异较小的病毒,可供选择的保守区域较多,这 3 种方法均可。其次,染料 RT-qPCR 法常存在引物二聚体的扩增信号,为避免其对结果判定的影响,可通过分析熔解曲线并依据在目的片段熔解温度出现的熔解峰来判定检测结果,病毒的不同株系/基因型间的序列差异使其熔解温度不同,可用来区分病毒的不同株系和基因型。如马铃薯 S 病毒(potato virus S, PVS)具有丰富的遗传多样性(Duan et al., 2018),可应用染料 RT-qPCR 法鉴定 PVS^A 和 PVS^O 株系(程胜群等, 2020)。AMV 具有一定的遗传多样性(Bergua et al., 2014; Nie et al., 2020),本研究中 AMV RNA 3 的 EvaGreen RT-qPCR 检测结果也表明阳性样品 GS 515 和 HLJ 430 目的片段核酸序列存在较大差异。本试验结果表明 3 种方法均可有效检测采自甘肃省、宁夏回族自治区和黑龙江省的 AMV 分离株,表明这 3 种方法均适用于 AMV 的检测工作。

本研究建立的 TaqMan 探针 RT-qPCR 法检测 AMV RNA 1 和 RNA 2 的检测灵敏度为 10¹ copies/μL 重组质粒,与 PVY TaqMan 探针 RT-qPCR 法(Dai et

al., 2012)检测灵敏度为同一数量级,而 RNA 3 检出限为 1.15×10² copies/μL 重组质粒,可能与引物 3-1749 F/3-1957 R 的扩增效率比引物 3-1522 F/3-1629 R 低有关。EvaGreen RT-qPCR 法对 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的检测灵敏度与 SYBR Green RT-qPCR 法对 PVY (Hühnlein et al., 2013) 和柑橘叶斑驳病毒(citrus leaf blotch virus, CLB) (刘欢等, 2019) 的检测灵敏度及 SYBR Green qPCR 法对柑橘褪绿矮缩病毒(citrus chlorotic dwarf-associated virus, CCDaV) (王瑛丽等, 2019) 和番茄煤污假尾孢的(康华军等, 2019) 的检测灵敏度一致,均为 10² copies/μL 重组质粒。探针 RT-qPCR 法对 PVY (Klerks et al., 2001; Agindotan et al., 2007)、柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV) (Saponari et al., 2008) 以及 SYBR Green RT-qPCR 法对 CLB (刘欢等, 2019) 的检测灵敏度是常规 RT-PCR 法的 100 倍, SYBR Green qPCR 法对 CCDaV (王瑛丽等, 2019) 和番茄煤污假尾孢的检测灵敏度分别是 PCR 法的 100 倍和 1 000 倍(康华军等, 2019)。但是本研究中 EvaGreen RT-qPCR 法与 RT-PCR 法对 AMV RNA 1 和 RNA 2 的检测灵敏度相同, TaqMan 探针 RT-qPCR 法的检测灵敏度仅为上述 2 种方法的 10 倍; TaqMan 探针 RT-qPCR 法和 EvaGreen RT-qPCR 法对 AMV RNA 3 的检测灵敏度相同,为 RT-PCR 法的 10 倍,说明 RT-PCR 法对 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的检测灵敏度比较高,可能与目的片段较短、引物扩增效率较高有关。

本研究结果显示,采用 TaqMan 探针 RT-qPCR 法检测 AMV RNA 1、RNA 2 和 RNA 3 的标准曲线在 10¹~10⁹ copies/μL 时, Ct 值与重组质粒拷贝数对数存在良好的线性关系; 而 EvaGreen RT-qPCR 法检测 RNA 1 和 RNA 2 含量在 10³~10⁹ copies/μL、检测 RNA 3 含量在 10⁴~10⁹ copies/μL 时有良好的线性关系,与刘欢等(2019)采用 SYBR Green RT-qPCR 法检测 CLB 的标准曲线在 10³~10⁹ copies/μL 时有良好的线性关系的结论相似。可能与低浓度重组质粒扩增时出现了引物二聚体扩增信号有关,干扰了病毒 RNA 定量分析,导致染料 RT-qPCR 法无法准确测定低浓度样品中的病毒含量。在测定不同组织中病原物时, SYBR Green RT-qPCR 法可检测到猕猴桃休眠枝条和叶片 2 种组织中的 CLB (刘欢等, 2019); RT-qPCR 法可检测到苹果树枝皮、果实和根 3 种组织中的苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd) (郝娜娜等, 2020); EvaGreen RT-qPCR 法可准确检测出马铃薯叶片、叶柄、茎、根和休眠块茎

5种组织中的PVS(程胜群等,2020)。本研究建立的TaqMan探针RT-qPCR法能够检测到马铃薯叶片、叶柄、茎、匍匐茎、根和休眠块茎6种组织中的AMV,各组织中RNA 1、RNA 2和RNA 3的含量相对稳定,6种组织均可用于AMV的检测。3株丽薯15号和中薯21号(50-1)6种组织中AMV的含量为 $10^6 \sim 10^8$ copies/ μ L,与程胜群等(2020)报道马铃薯5种组织中PVS含量相似,但中薯21号(50-2)休眠块茎中AMV含量仅为 10^2 copies/ μ L,其他5种组织中AMV含量在 $10^7 \sim 10^8$ copies/ μ L之间;上述5个植株叶片中AMV含量除丽薯15号植株35-1的RNA 2和RNA 3以外均高于块茎,与Kogovšek et al.(2011)检测感染PVY马铃薯植株叶片和块茎时发现块茎中PVY浓度常低于叶片的结论一致,Nie & Singh(2001)也发现应用RT-PCR法检测马铃薯品种夏波蒂叶片和块茎样品时,叶片样品的检测结果比块茎样品更可靠。在果树枝干嫁接接种ASSVd后,ASSVd先在接种枝中增殖,然后向根部转移(郝娜娜等,2020),那么在马铃薯上部叶片接种AMV后是否需要一定的时间转移到块茎中尚需进一步研究。此外,马铃薯品种中薯21号植株50-3中AMV含量则相反,块茎中含量较高,为 10^8 copies/ μ L,其他5种组织中含量为 $10^3 \sim 10^4$ copies/ μ L,可能与样品采集时50-3植株已经黄化有关。因此,AMV含量在3株中薯21号间差异较大,可能与植株和块茎成熟度不一致有关。

蚜虫是传播PVY、AMV和PLRV等病毒的重要介体,应用RT-PCR法可检测到单头蚜虫体内大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV)(成卓敏等,1992)、CTV(刘永清等,2010)和PLRV(韩树鑫等,2016)。本研究在单头蚜虫体内检测到AMV。在提取蚜虫总RNA时,韩树鑫等(2016)将蚜虫用液氮冷冻并粉碎后应用TRIzol法提取,而本研究未使用液氮,直接将蚜虫置于装有TRIzol试剂的EP管中研磨,操作更简单。经测定单头桃蚜体内AMV RNA 1含量为 $4.74 \times 10^3 \sim 2.42 \times 10^4$ copies/ μ L, Saponari et al.(2008)测定棉蚜*Aphis gossypii*获毒48 h后CTV含量为 $1.2 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^7$ copies/ μ L,病毒含量有差异可能与蚜虫及病毒种类不同有关。此外,蚜虫体内AMV RNA 3含量最低,表明RNA 1和RNA 2更适合用于AMV检测。蓟马是为害马铃薯生产的重要昆虫之一,云南省马铃薯田发现13种蓟马(杜霞等,2020)。已报道15种蓟马能传播植物病毒,是番茄斑萎病毒属*Tospovirus*、等轴不稳环斑病毒属*Ilarvirus*、香石竹斑萎病毒属*Carmovirus*、南方菜豆

花叶病毒属*Sobemovirus*和玉米褪绿斑驳病毒属*Machlomovirus*的18种病毒的传播媒介(谢永辉等,2013)。目前,虽然未见蓟马传播AMV的报道,但Li et al.(2021)应用转录组测序技术在蓟马体内检测到了AMV,本研究应用RT-qPCR法从单头蓟马体内也检测到了AMV,为进一步研究AMV的传播介体提供了参考依据。此外,蓟马体内AMV RNA 1含量明显高于RNA 2和RNA 3,更适用于携带AMV样品的检测。AMV RNA 1和RNA 2分别编码复制酶基因的2个亚基P1和P2, RNA 3编码运动蛋白(movement protein, MP)和衣壳蛋白(coat protein, CP),但CP蛋白由亚基因组RNA 4翻译而来(Bol, 2008)。P1包含C端螺旋酶结构域和N端甲基转移酶结构域,在RNA包装和负链RNA合成中起作用(Vlot et al., 2002), P2含聚合酶结构域, MP蛋白与病毒细胞间运动有关, CP蛋白与病毒粒子形成、正链RNA的积累、复制、翻译以及运动等(Bol, 2005; Krab et al., 2005)相关。那么,AMV中RNA 1含量明显高于RNA 2和RNA 3是否预示着AMV在蓟马体内存在复制等活动尚需进一步研究。

马铃薯6种组织中和蓟马体内AMV RNA 1、RNA 2和RNA 3的含量以及蚜虫体内AMV RNA 1和RNA 2的含量均高于TaqMan探针RT-qPCR法和EvaGreen RT-qPCR法对AMV的检出限,因此这2种方法适用于检测上述样品。此外,马铃薯6种组织中以及蓟马和蚜虫体内AMV RNA 1、RNA 2的含量高于RT-PCR法对AMV的检出限,因此RT-PCR法也可用于检测上述样品。部分马铃薯休眠块茎样品中AMV含量低于RT-PCR法对RNA 3的检出限,因此RT-PCR法不适合检测马铃薯休眠块茎中的AMV RNA 3,但可用来检测其他5种马铃薯组织及蓟马体内的AMV RNA 3。总之,本研究所建RT-PCR、EvaGreen RT-qPCR和TaqMan探针RT-qPCR这3种方法均可用于检测马铃薯组织中以及蓟马和蚜虫体内的AMV。

参考文献 (References)

- Abdalla OA, Al-Shahwan IM, Al-Saleh MA, Amer MA. 2020. Molecular characterization of alfalfa mosaic virus (AMV) isolates in alfalfa and other plant species in different regions in Saudi Arabia. *European Journal of Plant Pathology*, 156(2): 603–613
- Abdel Aleem EE, Taha RM, Fattouh FA. 2018. Biodiversity and full genome sequence of potato viruses alfalfa mosaic virus and potato leaf roll virus in Egypt. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 73(11/12): 423–438

- Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142(1/2): 1–9
- Alhudaib KA. 2019. Serological and molecular detection of alfalfa mosaic virus in the major potato growing areas of Saudi Arabia. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, 20(1): 73–82
- Bai YJ, Li XZ, Wen JZ, Yang MX. 2006. Analysis on the standardization of potato varieties in China and the Netherlands. *Chinese Potato Journal*, 20(6): 357–359 (in Chinese) [白艳菊, 李学湛, 文景芝, 杨明秀. 2006. 中国与荷兰马铃薯种薯标准化程度比较分析. *中国马铃薯*, 20(6): 357–359]
- Bergua M, Luis-Arteaga M, Escrivá F. 2014. Genetic diversity, reassortment, and recombination in alfalfa mosaic virus population in Spain. *Phytopathology*, 104(11): 1241–1250
- Bol JF. 2003. Alfalfa mosaic virus: coat protein-dependent initiation of infection. *Molecular Plant Pathology*, 4(1): 1–8
- Bol JF. 2005. Replication of alfalfa- and ilarviruses: role of the coat protein. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 39–62
- Bol JF. 2008. Alfalfa mosaic virus. // Mahy BWJ, van Regenmortel MHV. *Encyclopedia of virology*. 3rd edition. Amsterdam: Elsevier, pp. 81–87
- Cheng SQ, Lü WH, Gao YL, Bai YJ, Fan GQ, Zhang W, Zhang S, Qiu CL, Shen Y, Dong XZ, et al. 2020. Development and application of RT-qPCR assay for detection of potato virus S by universal detection system. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 35(6): 187–194 (in Chinese) [程胜群, 吕文河, 高艳玲, 白艳菊, 范国权, 张威, 张抒, 邱彩玲, 申宇, 董学志, 等. 2020. 马铃薯 S 病毒 RT-qPCR 通用检测体系的建立与应用. *华北农学报*, 35(6): 187–194]
- Cheng ZM, Waterhouse PM, Wang LY, Zhou GH, Chen JB. 1992. Detection of barley yellow dwarf virus (BYDV) in single aphid by using polymerase chain reaction. *Chinese Journal of Virology*, 8(1): 80–84 (in Chinese) [成卓敏, Waterhouse PM, 王立阳, 周广和, 陈剑波. 1992. 应用聚合酶链式反应方法检测携带大麦黄矮病毒的单头蚜虫. *病毒学报*, 8(1): 80–84]
- Clark AJ, Perry KL. 2002. Transmissibility of field isolates of soybean viruses by *Aphis glycines*. *Plant Disease*, 86(11): 1219–1222
- Dai J, Peng H, Chen W, Cheng J, Wu Y. 2013. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three potyviruses in tobacco plants. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2): 502–508
- Du X, Wu K, Liu X, Zhang LZ, Su XX, Zhang HR, Zhang ZK, Hu XQ, Dong JH, Yang YL, et al. 2020. The occurrence trends of dominant species of potato viruses and thrips in Yunnan Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 53(3): 551–562 (in Chinese) [杜霞, 吴阔, 刘霞, 张丽珍, 苏晓霞, 张宏瑞, 张仲凯, 胡先奇, 董家红, 杨艳丽, 等. 2020. 云南省马铃薯病毒及蓟马优势种发生趋势. *中国农业科学*, 53(3): 551–562]
- Duan GH, Zhan FF, Du ZG, Ho SYW, Gao FL. 2018. Europe was a hub for the global spread of potato virus S in the 19th century. *Virology*, 525: 200–204
- FAOSTAT. 2020. Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Feng LX, Yang CR. 1991. Surveillance of the original species of tomato virus and identification of cucumber mosaic virus strains in Beijing area. *China Vegetables*, (5): 9–11 (in Chinese) [冯兰香, 杨翠荣. 1991. 北京地区番茄病毒病毒原种类的监测与黄瓜花叶病毒株系的鉴定. *中国蔬菜*, (5): 9–11]
- Gao SQ, Liang J, Guo K, Zhou X, Su X. 2020. First report of alfalfa mosaic virus in *Cayratia japonica*, *Justicia procumbens* and *Veronica persica* in China. *Journal of Plant Pathology*, 102(1): 267
- Gibbs AJ, Tinsley TW. 1961. Lucerne mosaic virus in Great Britain. *Plant Pathology*, 10(2): 61–62
- Hajimorad MR, Francki RIB. 1988. Alfalfa mosaic virus isolates from lucerne in South Australia: biological variability and antigenic similarity. *Annals of Applied Biology*, 113(1): 45–54
- Halterman D, Charkowski A, Verchot J. 2012. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology*, 6(1): 1–14
- Han SX, Bai YJ, Zhang W, Gao YL, Fan GQ, Zhang S, Shen Y. 2016. Improved method detection potato leafroll virus in aphids. *Guhaia*, 36(8): 986–992 (in Chinese) [韩树鑫, 白艳菊, 张威, 高艳玲, 范国权, 张抒, 申宇. 2016. 蚜虫中携带马铃薯卷叶病毒检测方法的改进. *广西植物*, 36(8): 986–992]
- He B, Fajolu OL, Wen RH, Hajimorad MR. 2010. Seed transmissibility of alfalfa mosaic virus in soybean. *Plant Health Progress*, 11(1): 41
- He B, Hill JH, Hajimorad MR. 2011. Factors to improve detection of alfalfa mosaic virus in soybean. *Plant Health Progress*, 12(1): 8
- Hill JH, Alleman R, Hogg DB, Grau CR. 2001. First report of transmission of soybean mosaic virus and alfalfa mosaic virus by *Aphis glycines* in the New World. *Plant Disease*, 85(5): 561
- Huang XW, Du Q, Bi JS, Wei ZJ, Zou LB, Zhao ZX, Yan XK, Han ZX, Xin JL, Zheng M. 2020. Establishment and application of SYBR green I real-time PCR for detection of PCV4. *China Animal Health Inspection*, 37(10): 109–113 (in Chinese) [黄小武, 杜倩, 闭珊珊, 韦正吉, 邹联斌, 赵子欣, 闫修魁, 韩知晓, 辛佳亮, 郑敏. 2020. PCV4 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用. *中国动物检疫*, 37(10): 109–113]
- Hühnlein A, Drechsler N, Steinbach P, Thieme T, Schubert J. 2013. Comparison of three methods for the detection of potato virus Y in seed potato certification. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120(2): 57–69
- Jin LL, Zhang BH, Chen JS. 2015. Complete nucleotide sequence and biological characteristics of a new alfalfa mosaic virus isolate infecting *Trifolium repens*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 29(6): 1061–1067 (in Chinese) [金磊磊, 张本厚, 陈集双. 2015. 1 株侵染白三叶草的苜蓿花叶病毒全基因组序列分析及其寄主生物学研究. *核农学报*, 29(6): 1061–1067]
- Kang HJ, Chai AL, Shi YX, Xie XW, Guo JG, Li BJ. 2019. Establishment and application of real-time quantitative PCR assay for detection of fungal pathogen *Pseudocercospora fuligena* in tomato.

- Journal of Plant Protection, 46(6): 1214–1221 (in Chinese) [康华军, 柴阿丽, 石延霞, 谢学文, 郭建光, 李宝聚. 2019. 番茄煤污假尾孢叶斑病菌实时荧光定量PCR检测技术的建立及应用. 植物保护学报, 46(6): 1214–1221]
- Klerks MM, Leone GOM, Verbeek M, van den Heuvel JFJM, Schoen CD. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers. Journal of Virological Methods, 93(1/2): 115–125
- Kogovšek P, Kladnik A, Mlakar J, Znidarič MT, Dermastia M, Ravnikar M, Pompe-Novak M. 2011. Distribution of potato virus Y in potato plant organs, tissues, and cells. Phytopathology, 101(11): 1292–1300
- Komuro Y, Kawada T, Hirano Y, Muroki M. 1964. Occurrence of potato calico disease, caused by alfalfa mosaic virus, in Japan. Japanese Journal of Phytopathology, 29(4): 199–205
- Krab IM, Caldwell C, Gallie DR, Bol JF. 2005. Coat protein enhances translational efficiency of alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. The Journal of General Virology, 86(Pt 6): 1841–1849
- Lei CY, Lou BH, Song YQ, Chen AJ, He JJ, Liu P. 2019. Development of a PCR detection method for leaf spot pathogen *Pseudocercospora vitis*. Journal of Plant Protection, 46(4): 929–930 (in Chinese) [雷翠云, 娄兵海, 宋雅琴, 陈爱军, 何建军, 刘萍. 2019. 葡萄拟尾孢菌PCR检测方法的建立. 植物保护学报, 46(4): 929–930]
- Li J, Gu HC, Liu YQ, Wei SH, Hu GX, Wang XM, McNeill MR, Ban LP. 2021. RNA-seq reveals plant virus composition and diversity in alfalfa, thrips, and aphids in Beijing, China. Archives of Virology, 166(6): 1711–1722
- Li ZF. 2004. Illustrated handbook of the main potato virus in China. Beijing: China Agriculture Press, pp. 97–102 (in Chinese) [李芝芳. 2004. 中国马铃薯主要病毒图鉴. 北京: 中国农业出版社, pp. 97–102]
- Li ZN, Lu XK, SUN PP, Sheng JH, Song Sh. 2019. Complete genome sequence of alfalfa mosaic virus, infecting *Mentha haplocalyx* in China. Phytopathologia Mediterranea, 58(3): 663–669
- Liu H, Mi WL, Liu F, Wu W, Wu K, Wu YF. 2019. Development and evaluation of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of citrus leaf blotch virus in kiwifruit plants. Acta Phytopathologica Sinica, 49(2): 167–173 (in Chinese) [刘欢, 米伟丽, 刘斐, 吴宽, 吴云锋. 2019. 猕猴桃植株中柑橘叶斑病毒实时荧光定量PCR检测技术的建立及应用. 植物病理学报, 49(2): 167–173]
- Liu YQ, Cao MJ, Wang XF, Li ZA, Tang KZ, Zhou CY. 2010. Rapid molecular detection technologies of citrus tristeza virus in plant tissues and single aphid. Scientia Agricultura Sinica, 43(7): 1397–1403 (in Chinese) [刘永清, 曹孟籍, 王雪峰, 李中安, 唐科志, 周常勇. 2010. 植物组织和单头蚜虫中柑橘衰退病毒的快速分子检测技术. 中国农业科学, 43(7): 1397–1403]
- Lu MH, Li LJ, Ma YH, Wang XB, Guo BL, Wang XE. 2019. Establishment and application of TaqMan fluorescence probe real-time PCR detection for the pathogen of konjac soft rot. Journal of Plant Protection, 46(5): 1100–1109 (in Chinese) [卢美欢, 李利军, 马英辉, 王晓兵, 郭邦利, 王晓娥. 2019. 魔芋软腐病原菌TaqMan荧光探针PCR技术的建立及应用. 植物保护学报, 46(5): 1100–1109]
- Nie X, Singh RP. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. Journal of Virological Methods, 91(1): 37–49
- Nie XZ, Dickison V, Singh M, de Koeyer D, Xu HM, Bai YJ, Hawkins G. 2020. Potato tuber necrosis induced by alfalfa mosaic virus depends on potato cultivar rather than on virus strain. Plant Disease, 104(2): 340–347
- Panter S, Chu PG, Ludlow E, Garrett R, Kalla R, Jahufer MZZ, de Lucas Arbiza A, Rochfort S, Mouradov A, Smith KF, et al. 2012. Molecular breeding of transgenic white clover (*Trifolium repens* L.) with field resistance to alfalfa mosaic virus through the expression of its coat protein gene. Transgenic Research, 21(3): 619–632
- Park CY, Min HG, Shin GE, Oh J, Lee SH. 2018. First report of alfalfa mosaic virus in *Ligularia fischeri* in Korea. Journal of Plant Pathology, 100(1): 133
- Parrella G, Lanave C, Marchoux G, Finetti Sialer MM, Di Franco A, Gallitelli D. 2000. Evidence for two distinct subgroups of alfalfa mosaic virus (AMV) from France and Italy and their relationships with other AMV strains. Archives of Virology, 145(12): 2659–2667
- Parrella G, Acanfora N, Bellardi MG. 2010. First record and complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus from *Lavandula stoechas* in Italy. Plant Disease, 94(7): 924
- Porter DR. 1931. The infectious nature of potato calico. Hilgardia, 6(9): 277–294
- Rahman F, Peadar RN. 1993. Incidence of viruses on alfalfa in western North America. Plant Disease, 77(2): 160
- Saponari M, Manjunath K, Yokomi RK. 2008. Quantitative detection of citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). Journal of Virological Methods, 147(1): 43–53
- Shah DA, Dillard HR, Mazumdar-Leighton S, Gonsalves D, Nault BA. 2006. Incidence, spatial patterns, and associations among viruses in snap bean and alfalfa in New York. Plant Disease, 90(2): 203–210
- Shen Y, Bai YJ, Liu WT, Zhang W, Wang XD. 2014. Inspiration from development of potato industry in Holland to China. Chinese Potato Journal, 28(4): 243–246 (in Chinese) [申宇, 白艳菊, 刘伟婷, 张威, 王晓丹. 2014. 荷兰马铃薯种业发展对中国的启示. 中国马铃薯, 28(4): 243–246]
- Song S, Liu H, Zhang JH, Pan CQ, Li ZN. 2019. Identification and characterization of complete genome sequence of alfalfa mosaic virus infecting *Gynostemma pentaphyllum*. European Journal of Plant Pathology, 154(2): 491–497
- Song Z, Liu KH, Chen HM, Wang YJ, Li ZA, Zhou CY. 2017. Development and application of a one-step reverse transcription quan-

- titative PCR (RT-qPCR) assay for the detection of citrus yellow vein clearing virus. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 175–176 (in Chinese) [宋震, 刘科宏, 陈洪明, 王艳娇, 李中安, 周常勇. 2017. 柑橘黄化脉明病毒一步法RT-qPCR检测体系的建立及应用. *植物保护学报*, 44(1): 175–176]
- Song ZQ, Wang X, Lin Y, Chi YK, Ju YL, Li HM. 2013. Detection and quantification of *Meloidogyne incognita* in soil sample using real-time PCR. *Journal of Plant Protection*, 40(3): 255–260 (in Chinese) [宋志强, 王暄, 林宇, 迟元凯, 鞠玉亮, 李红梅. 2013. 土壤中南方根结线虫的实时荧光PCR检测和定量. *植物保护学报*, 40(3): 255–260]
- Tian RY, Feng LX, Cai SH. 1989. Identification of the original species of pepper virus and cucumber mosaic virus strain in Beijing area. *Plant Protection*, 15(4): 9–11 (in Chinese) [田如燕, 冯兰香, 蔡少华. 1989. 北京地区辣椒病毒病原种类及黄瓜花叶病毒株系鉴定. *植物保护*, 15(4): 9–11]
- Trucco V, de Breuil S, Beijerman N, Lenardon S, Giolitti F. 2014. Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Argentina. *Virus Genes*, 48(3): 562–565
- Vlot AC, Menard A, Bol JF. 2002. Role of the alfalfa mosaic virus methyltransferase-like domain in negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, 76(22): 11321–11328
- Wang YL, Wang Q, Liu YJ, Yang Z, Li XY, Zhou Y. 2019. Establishment and application of a quantitative PCR assay for the detection of citrus chlorotic dwarf-associated virus. *Journal of Plant Protection*, 46(4): 931–932 (in Chinese) [王瑛丽, 王琴, 刘莹洁, 杨真, 李雪燕, 周彦. 2019. 柑橘褪绿矮缩病毒实时荧光定量PCR检测体系的建立与应用. *植物保护学报*, 46(4): 931–932]
- Wang RY, Ghabrial SA. 2002. Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, *Aphis glycines*. *Plant Disease*, 86(11): 1260–1264
- Wang ZH, Wang WP, Yuan EP, Su F, Mao QY, Wan QL, Cai H. 2020. Identification of *Camptotheca acuminata* witches' broom phytoplasma and TaqMan-based fluorescence qPCR method for detection. *Acta Phytopathologica Sinica*, 51(3): 429–440 (in Chinese) [王柱华, 王文鹏, 袁恩平, 苏帆, 毛清源, 万琼莲, 蔡红. 2021. 喜树丛枝植原体的分子鉴定及TaqMan探针实时荧光定量PCR检测方法的建立. *植物病理学报*, 51(3): 429–440]
- Wei NS, Li Y. 1987. Study on alfalfa mosaic virus-white clover isolate (Wc). *Virologica Sinica*, 2(4): 54–61 (in Chinese) [魏宁生, 李毅. 1987. 苜蓿花叶病毒(AMV)白三叶草分离物-Wc的研究. *病毒学杂志*, 2(4): 54–61]
- Wen ZH, Nan ZB. 2015. Detection of pathogenic organisms in *Medicago sativa* in Zhangye, Gansu Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 24(4): 121–126 (in Chinese) [文朝慧, 南志标. 2015. 甘肃省张掖地区苜蓿花叶病原的检测. *草业学报*, 24(4): 121–126]
- Wen ZH, Yu L, Wang YQ. 2018. Detection of viral pathogens in *Medicago sativa* seeds. *Pratacultural Science*, 35(11): 2704–2710 (in Chinese) [文朝慧, 余玲, 王玉青. 2018. 紫花苜蓿种带病毒的检测. *草业科学*, 35(11): 2704–2710]
- Xi NN, Li ZT, Zhang JY, Meng XL, Wang YN, Cao KQ. 2020. Detection of apple scar skin viroid by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR and its movement in an apple tree. *Journal of Plant Protection*, 47(6): 1304–1312 (in Chinese) [郝娜娜, 李紫腾, 张静怡, 孟祥龙, 王亚南, 曹克强. 2020. 苹果锈果类病毒实时荧光定量反转录PCR检测及其在苹果树体内的扩散转移规律. *植物保护学报*, 47(6): 1304–1312]
- Xie YH, Zhang HR, Liu J, Li ZY. 2013. Advances in research on vector thrips species (Thysanoptera, Thripidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1726–1736 (in Chinese) [谢永辉, 张宏瑞, 刘佳, 李正跃. 2013. 传毒蓟马种类研究进展(缨翅目, 蓟马科). *应用昆虫学报*, 50(6): 1726–1736]
- Xu H, Nie J. 2006. Identification, characterization, and molecular detection of alfalfa mosaic virus in potato. *Phytopathology*, 96(11): 1237–1242
- Zhang HL, Guo SH. 1983. The isolation and identification of alfalfa mosaic virus strain causing potato-calico. *Acta Microbiologica Sinica*, 23(3): 238–243, 290 (in Chinese) [张鹤龄, 郭素华. 1983. 苜蓿花叶病毒马铃薯杂斑株系的分离和鉴定. *微生物学报*, 23(3): 238–243, 290]
- Zhang XW. 2016. Molecular identification and detection of lucerne witches' broom and mosaic disease in Xinjiang. Master thesis. Urumqi: Xinjiang Agricultural University (in Chinese) [张芯伪. 2016. 新疆苜蓿丛枝病和花叶病原分子鉴定与检测. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学]

(责任编辑:李美娟)