

基于 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR 检测兰花环斑病毒方法的建立

孙爱青^{1,2}, 王丽花^{*1}, 杨秀梅¹, 许凤¹, 张艺萍¹, 苏艳¹

1 云南省农业科学院花卉研究所 云南省花卉育种重点实验室 国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南 昆明 650205

2 云南大学资源植物研究院农学院, 云南 昆明 650091

孙爱青, 王丽花, 杨秀梅, 许凤, 张艺萍, 苏艳. 基于 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR 检测兰花环斑病毒方法的建立[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4510-4521.

SUN Aiqing, WANG Lihua, YANG Xiumei, XU Feng, ZHANG Yiping, SU Yan. Development of a *TaqMan*-based real-time fluorescence quantitative PCR assay for CymRSV[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4510-4521.

摘要:【背景】兰花环斑病毒(cymbidium ringspot virus, CymRSV)是一类重要的检疫性病毒, 在世界范围内危害严重。【目的】建立一种特异性强、灵敏度高且能定量分析 CymRSV 携带情况的高效检测方法。【方法】通过比对 5 个 CymRSV CP 基因序列, 利用高度保守区设计 3 对引物探针并优化筛选后, 获得 145 bp 的靶标序列及对应的最优引物及探针组合。以该靶标序列为模板构建阳性重组质粒, 建立标准曲线, 并探究其灵敏度、特异性、稳定性和应用效果。【结果】建立的 CymRSV 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)检测法对阳性质粒标准品的最低检出限可达 1 copy, 最低稳定检出限达 5 copies/ μ L, 是逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)灵敏度的 10^3 – 10^4 倍; 标准曲线 $y=-3.332x+40.371$ 显示, C_t 值与拷贝数的对数线性关系良好, 扩增效率为 99.6%, 相关系数 R^2 为 0.999; 与其他 5 种常见病毒反应均无扩增曲线, 检测特异性强; 批组内与批组间重复性试验 C_t 值变异系数均小于 0.6%, 重复性和稳定性较好。利用该方法对 4 类不同种属的 20 个兰花样品进行检测, 阳性对照在 C_t 为 23.31 出现扩增曲线, 阴性对照及样品未出现扩增曲线。【结论】基于 *TaqMan* 探针的 CymRSV 实时荧光定量 PCR 检测方法的成功创建, 可为开展兰花 CymRSV 病毒的精准检测与科学防控提供技术支撑。

关键词: 兰花环斑病毒; *TaqMan* 探针; 实时荧光定量 PCR; 兰花

资助项目: 云南省种子种业联合实验室项目(202205AR070001-05); 云南省标准化研究项目(2023BZHXM05); 省级重大专项科技计划(农业) (202102AE090052)

This work was supported by the Yunnan Seed Industry Joint Laboratory Project (202205AR070001-05), the Standardization Research Project of Yunnan Province (2023BZHXM05), and the Provincial Major Special Science and Technology Program (Agriculture) (202102AE090052).

*Corresponding author. E-mail: wanglihua2525@outlook.com

Received: 2023-03-22; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-07-06

Development of a *TaqMan*-based real-time fluorescence quantitative PCR assay for CymRSV

SUN Aiqing^{1,2}, WANG Lihua^{*1}, YANG Xiumei¹, XU Feng¹, ZHANG Yiping¹, SU Yan¹

1 National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Yunnan Key Laboratory for Flower Breeding, Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

2 School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: **[Background]** Cymbidium ringspot virus (CymRSV) is an important phytosanitary virus, which is seriously harmful in the world. **[Objective]** To establish a specific and sensitive assay for the quantitative analysis of CymRSV. **[Methods]** According to the highly conserved region in five coat protein gene sequences of CymRSV, we designed three pairs of primers and three probes, and then obtained the target sequence (145 bp) and screened out the optimal primers and probe. We then used the target sequence as a template to construct a positive recombinant plasmid and established a standard curve, on the basis of which the sensitivity, specificity, stability, and performance of the established assay were explored. **[Results]** In this study, the established RT-qPCR detection method for CymRSV showed that the minimum limit of detection of 1 copy for the positive plasmid standards and the minimum limit of stable detection of 5 copies/ μL , demonstrating the sensitivity 10^3 – 10^4 times that of RT-PCR. The standard curve was $y = -3.332x + 40.371$ ($R^2 = 0.999$), which showed a good linear relationship between C_t value and logarithm of copy number and the amplification efficiency was 99.6%. The assay showed good specificity as it generated no amplification curve for other 5 common viruses. The intra-group and inter-group coefficients of variation of C_t value were less than 0.6%, which suggested good repeatability and stability. Furthermore, the established assay was employed to detect 20 samples of 4 orchid species. The positive control showed an amplification curve at C_t of 23.31, and the negative control and the samples showed no amplification curves. **[Conclusion]** The successful establishment of CymRSV RT-qPCR detection method based on *TaqMan* probe can provide technical support for the accurate detection and scientific prevention and control of orchid CymRSV virus.

Keywords: cymbidium ringspot virus (CymRSV); *TaqMan* probe; RT-qPCR; orchids

兰花环斑病毒(cymbidium ringspot virus, CymRSV)也称为大花蕙兰环斑病毒、建兰环斑病毒等, 设施条件下可广泛侵染蝴蝶兰、大花蕙兰、建兰和文心兰等兰科植物, 属番茄丛矮病毒科番茄丛矮病毒属(Tombusvirus)病毒, 1963年在英国南部的蕙兰(*Cymbidium*)上被首次发现^[1]。侵染该病毒后, 造成植株矮小、畸

形, 叶片褪绿、坏死、斑驳、焦枯, 以及花朵变色、易脱落等症状, 导致产量和质量下降。CymRSV遗传特性稳定, 通过汁液、器具污染、土壤或灌溉水等^[2]方式进行远距离或近距离传播。据不完全调查, CymRSV目前主要在欧洲、北美洲和南美洲等地发生, 在我国鲜有报道, 被列为我国兰花检疫性病毒之一^[3-4]。近年来,

在兰花进出口贸易中,一些检疫性病毒的可检出是决定进出口贸易顺利通关的必要条件^[3,5]。随着我国兰科植物种苗进出口渠道的多元化,种苗、盆花或切花产品的国内外贸易和种质交流频繁,增加了一些新型病毒病的发生和蔓延风险;另外,蝴蝶兰等兰科植物的种苗95%以上采用组培繁殖,长期无性繁殖导致病毒积累严重^[6]。因此,研究建立高效、定量化的CymRSV检测技术是获得优质健康原种材料、保证进出口兰花产品质量的关键。

目前,病毒的检测方法包括指示植物法、电子显微镜技术、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和逆转录环介导的等温扩增(reverse transcription-loop mediated isothermal amplification, RT-LAMP)、逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)等^[7-10]。其中,实时荧光定量PCR技术因其快速、高效、特异性强、灵敏度高等优点,已广泛应用于人类、动物感染疾病诊断^[11]、转基因产品检测、基因表达量分析和植物的微生物检测工作中^[12],检测对象包括病毒^[13-14]、细菌^[15]、真菌^[16]、植原体^[17]和线虫^[18]等,具有广阔的发展应用空间。CymRSV是RNA单链病毒,容易发生变异,国内外学者的研究更多集中在RNA沉默及遗传转化方面^[19-21],在检测技术研发方面报道不多,目前仅有陈金枝等^[3]建立了CymRSV的RT-LAMP、RT-PCR核酸检测法及多元抗体免疫检测法;Shahzad等采用SYBR[®] Green相对定量实时荧光法检测烟草中CymRSV等4种病毒的携带状况以及防御基因*EDS1*、*NPR1*和*PR2B*的表达水平,以此为基础进一步研究了植物促生菌ePGPB对4种病毒的系统抗性诱导作用和触发机制^[22];Agdia公司开发了CymRSV的DAS-Elisa免疫检

测试剂盒,大量应用于批量样品的商品化检测。但以上已报道的检测方法灵敏度和准确度有限,尤其CymRSV准确定量的早期监测亟须开发更为灵敏、高效的检测技术。基于TaqMan探针的实时荧光定量PCR技术实现了由定性到定量的飞跃,相较于其他检测技术,其更高效、更灵敏、更特异,特别在早期痕量病毒的精准检测方面应用效果尤为突出和优越。因此,本研究以蝴蝶兰为试材,创建基于TaqMan探针的CymRSV实时荧光定量PCR检测方法,为培养健康优质蝴蝶兰种苗、实现带毒苗/盆花的早发现、早隔离及早预防提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

感染CymRSV病毒的阳性对照样品购自Agdia公司,健康蝴蝶兰叶片来自云南省某蝴蝶兰公司,经RT-PCR检测为CymRSV阴性。

RNA提取试剂盒Mini BEST Plant RNA Extraction Kit、反转录试剂盒PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser、PCR试剂盒*Ex Taq*、胶回收试剂盒Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit ver.4.0、克隆载体pMD19-T Vector Cloning Kit、*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒Mini BEST Plasmid Purification Kit ver.4.0、TB Green法荧光试剂盒和TaqMan法实时荧光定量PCR试剂盒,宝日医生物技术(北京)有限公司;CymRSV免疫检测试剂盒,Agdia公司。实时荧光定量分析仪和凝胶成像仪,Bio-Rad公司;高速冷冻离心机,Thermo公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 引物、探针设计与筛选

从NCBI中下载5个CymRSV外壳蛋白(coat protein, CP)基因片段序列,经DNAMAN

比对找出高度保守区域, 利用 Primer 5.0 软件根据实时荧光定量 PCR 引物设计要求设计 CymRSV 的 3 对特异性引物和探针, 并在 NCBI 中进行 Primer-BLAST 比对, 以保证引物特异性。按照宝日医生物技术(北京)有限公司的 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒说明书提取样品 RNA 并反转录为 cDNA, 按照 PCR 程序^[23]开展 3 对引物最佳退火温度筛选及特异性确定, 并按照 TB Green 法荧光试剂盒说明书再次检测 3 对引物的特异性, 选择能产生明亮的单一条带、溶解曲线好且扩增效率高的引物合成其对应的探针, 序列如表 1 所示, 5'-端进行 Cy' 荧光基团修饰, 3'-端进行 BHQ 3 淬灭基团修饰。引物及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列合成。

1.3 RNA 提取及反转录 cDNA 合成

取蝴蝶兰植株的叶片 50–100 mg, 采用植物 RNA 提取试剂盒对蝴蝶兰叶片样品进行总 RNA 提取, 并反转录获得 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.4 病毒质粒标准品制备

以 cDNA 为模板, 用引物对 CymRSV-F/CymRSV-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25.0 μ L): 10 \times Ex Taq buffer (20 mmol/L) 2.5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.5 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, CymRSV-F (10 μ mol/L) 0.5 μ L, CymRSV-R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, RNase free ddH₂O 16.75 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min;

94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保温。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳获得单一目的条带, 并胶回收及纯化。纯化后产物连接到 pMD 19-T Vector, 并转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 筛选并提取阳性克隆子的质粒, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序正确的质粒用 Hind III 进行酶切, 将酶切产物取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳及胶回收, 将胶回收产物使用超微量分光光度计测定浓度, 置于 -20 °C 保存备用。

用分光光度计测定胶回收质粒浓度为 17.3 ng/ μ L, pMD 19-T 载体的碱基数为 2 692 bp, 每个碱基的平均分子量为 660 Da/bp, 扩增产物大小为 145 bp。每微升样品中检测基因拷贝数 (copies/ μ L) = 阿伏伽德罗常数 (6.02×10^{23}) \times 质粒浓度 (ng/ μ L) $\times 10^{-9}$ / (660 \times 重组质粒碱基数), 其中, 重组质粒碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。计算得出拷贝数为 5.56×10^9 copies/ μ L, 将其稀释为 5×10^9 copies/ μ L 作为质粒标准品。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测体系的优化

以 cDNA 为模板, 用引物对 CymRSV-F/CymRSV-R 和探针 CymRSV-Probe 进行实时荧光定量 PCR 扩增体系和条件的优化, 采用矩阵法分别对退火温度 (58、60 和 62 °C)、引物浓度 (1、10、20 和 50 μ mol/L) 及探针浓度 (1、10、20 和 50 μ mol/L) 进行优化, 根据扩增反应的 C_t 值和扩增曲线的荧光信号 (relative fluorescence units, RFU) 确定最佳退火温度和引物探针浓度。

表 1 引物探针信息

Table 1 Primers and probe information

引物名称	引物序列	产物长度
Primer name	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
CymRSV-F	CGCAGTGGGTGACTTATT	145
CymRSV-R	CGTCGTGGCTGTGGTAG	
CymRSV-Probe	CACAGTAACCTTCTACGAACCGCAACCG	

1.6 特异性检测

以携带 CymRSV 的样品为阳性对照、RNase free ddH₂O 为阴性对照,以检测携带有建兰花叶病毒(cymbidium mosaic virus, CymMV)、齿兰环斑病毒(odontoglossum ringspot virus, ORSV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、香石竹斑驳病毒(carnation mottle virus, CarMV)、百合斑驳病毒(lily mottle virus, LMoV)的样品 cDNA 为检测对象,进行 CymRSV 的实时荧光定量 PCR 特异性检测。

1.7 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

用 EASY Dilution 稀释 1.4 获得的 CymRSV 阳性质粒标准品初始模板,按 10 倍倍比梯度将其稀释为 5×10^8 – 5×10^1 copies/ μ L 这 8 个梯度。以 8 个梯度浓度阳性质粒标准品为模板,以 RNase free ddH₂O 为阴性对照,每样品重复 3 次,以 1.5 优化好的体系和条件进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测。得到动力学扩增曲线和 PCR 扩增循环阈值(C_t 值),以 C_t 值为纵坐标, \log_{10} (质粒拷贝数)为横坐标构建标准曲线。根据实时荧光定量 PCR 标准曲线的相关系数、斜率和扩增效率等验证该方法的有效性。

1.8 灵敏度检测

用 EASY Dilution 以 10 倍倍比梯度稀释的 5×10^8 – 5×10^1 copies/ μ L 的 CymRSV 质粒标准品为模板(每样品重复 3 次),利用优化后的体系进行实时荧光定量 PCR 扩增,计算该技术体系检测 CymRSV 的灵敏度。另外,利用上述梯度溶液进行 RT-PCR 检测,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后验证,与 TaqMan 实时荧光定量 PCR 敏感性的结果进行比较。

1.9 重复性试验

取 CymRSV 质粒标准品 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^3 和 5×10^2 copies/ μ L 作为模板,应

用所建立的实时荧光定量 PCR 体系及条件进行扩增,验证该方法的重复性。组内和组间重复性试验时均重复 3 次。计算平均 C_t 值、标准偏差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.10 田间抽样检测应用

于云南省某兰花公司中分别随机采集蝴蝶兰 12 株、紫香兰 5 株、文心兰 2 株、梦香兰 1 株共 20 株样品,按照 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒说明书分别提取 RNA 并反转录为 cDNA。以 RNase free ddH₂O 为阴性对照,质粒标准品为阳性对照,利用本研究建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法进行检测应用,并同时采用 CymRSV 抗体开展 DAS-Elisa 方法复测验证,检验该方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 体系的优化

图 1–3 结果显示,综合 C_t 值、RFU 值和经济角度,最适合的优化结果是退火温度为 60 °C、最适引物浓度为 20 μ mol/L、探针浓度为 10 μ mol/L。最终建立的实时荧光定量 PCR 最佳反应体系(25 μ L)为: Premix *Ex Taq* (2 \times)混合液 12.5 μ L, RNase free ddH₂O 8.5 μ L, CymRSV-F (20 μ mol/L) 0.5 μ L, CymRSV-R (20 μ mol/L) 0.5 μ L, 探针 CymRSV-Probe (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板 cDNA 2 μ L。实时荧光定量 PCR 最佳反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环,同时收集荧光信号。

2.2 特异性检测结果

以携带有 CymMV、ORSV、CMV、TMV、CarMV 和 LMoV 病毒基因片段的 cDNA 为模板,以 RNase free ddH₂O 作为阴性对照,利用优化的体系开展特异性检测。结果如图 4 所示,仅携带 CymRSV 的样品 A 出现扩增曲线,

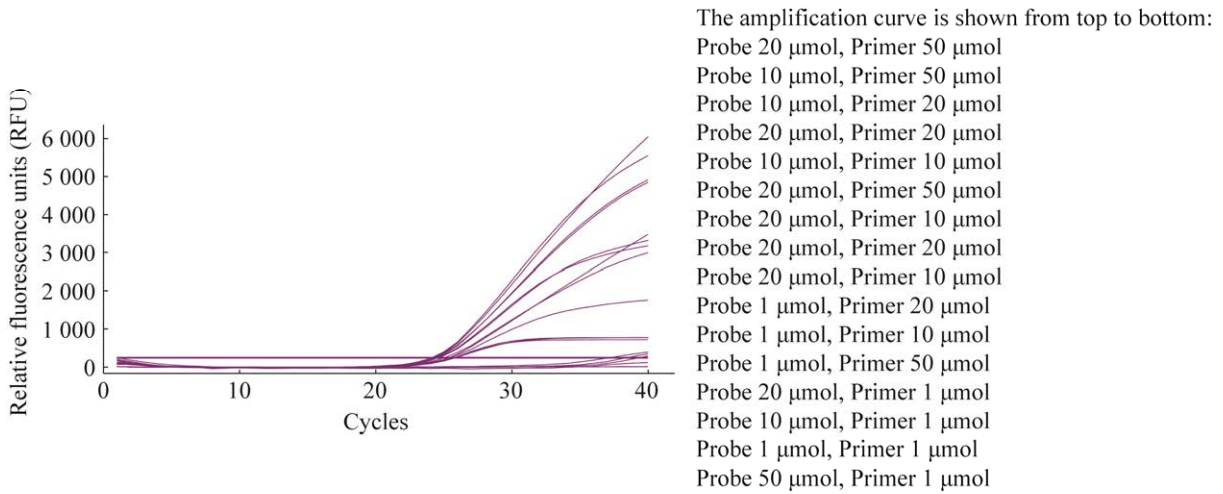


图 1 $T_m=58\text{ }^\circ\text{C}$ 下不同引物探针浓度实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 1 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of different primer probe concentrations at $T_m=58\text{ }^\circ\text{C}$.

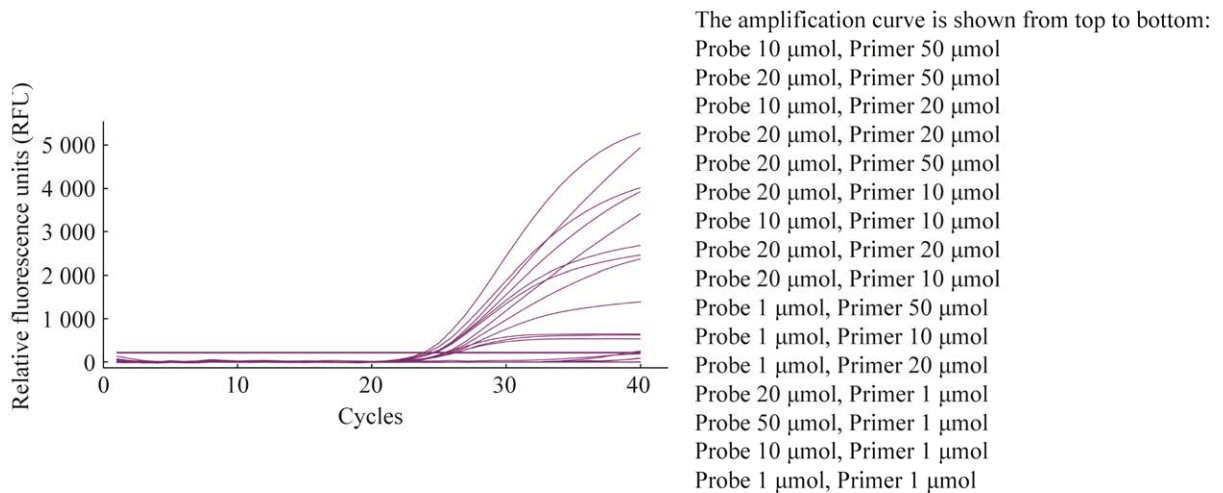


图 2 $T_m=60\text{ }^\circ\text{C}$ 下不同引物探针浓度实时荧光定量 PCR 扩增曲线

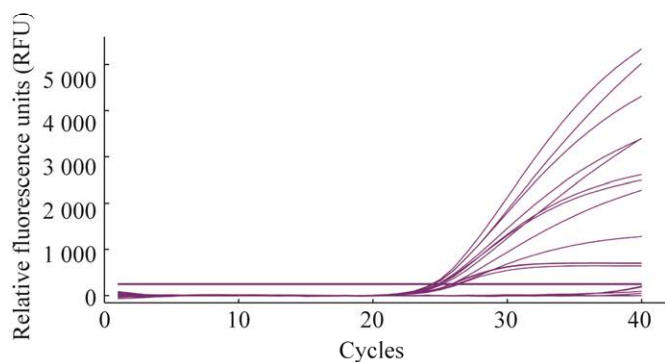
Figure 2 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of different primer probe concentrations at $T_m=60\text{ }^\circ\text{C}$.

且 C_t 值小于 35 个循环, 其余样品 B-H 均未出现扩增曲线, 即 CymRSV 检测结果为阳性, 而其他病毒检测结果为阴性, 表明本方法特异性好。

2.3 标准曲线

由建立标准曲线的扩增曲线可知(图 5), 随

着 CymRSV 的质粒拷贝数降低, C_t 值逐渐递增, 且两者之间呈现良好线性关系(图 6), 标准曲线斜率为 -3.332 , 相关系数为 $R^2=0.999$, 扩增效率为 $E=99.6\%$, 建立的方程为 $y=-3.332x+40.371$ 。结果显示所建立检测体系的荧光曲线与病毒浓度之间相关性好、准确性高。



The amplification curve is shown from top to bottom:

Probe 10 μmol , Primer 50 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 50 μmol
 Probe 10 μmol , Primer 20 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 20 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 50 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 10 μmol
 Probe 10 μmol , Primer 10 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 20 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 10 μmol
 Probe 1 μmol , Primer 50 μmol
 Probe 1 μmol , Primer 20 μmol
 Probe 1 μmol , Primer 10 μmol
 Probe 1 μmol , Primer 1 μmol
 Probe 10 μmol , Primer 1 μmol
 Probe 50 μmol , Primer 1 μmol
 Probe 20 μmol , Primer 1 μmol

图3 $T_m=62\text{ }^\circ\text{C}$ 下不同引物探针浓度实时荧光定量PCR扩增曲线

Figure 3 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of different primer probe concentrations at $T_m=62\text{ }^\circ\text{C}$.

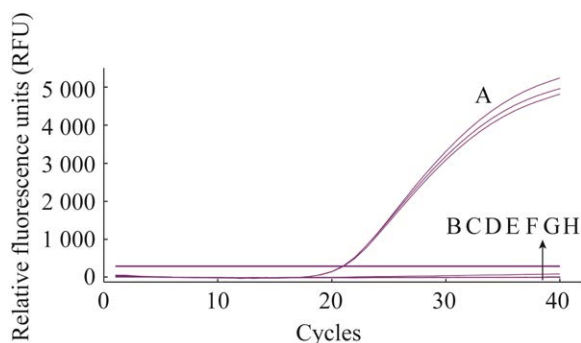


图4 实时荧光定量PCR特异性检测扩增曲线

Figure 4 The amplification curves for specific detection by real-time fluorescence quantitative PCR. A: CymRSV; B: CymMV; C: ORSV; D: CMV; E: TMV; F: CarMV; G: LMoV; H: Negative control.

2.4 灵敏度检测结果

利用所建立的 RT-qPCR 最佳体系和条件对 CymRSV 病毒的 10 个浓度梯度阳性质粒标准品开展灵敏度对比试验,结果显示最低检出限为 1 copy,最低稳定检出限为 5 copies/ μL (图 7),而 RT-PCR 能检测到的原标准品最低稀释浓度仅为 5×10^3 copies/ μL (图 8),表明本研究建立的 CymRSV 实时荧光定量 PCR 检测法的灵敏度是

RT-PCR 技术的 10^3-10^4 倍。

2.5 重复性试验结果

以 CymRSV 5 个浓度(5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^3 和 5×10^2 copies/ μL)的阳性标准品为模板进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测,分别验证该方法的批组内和批组间的重复性、稳定性。结果如表 2 所示, C_t 值的变异系数在组内与组间重复性试验中均小于 0.6%,表明该方法对

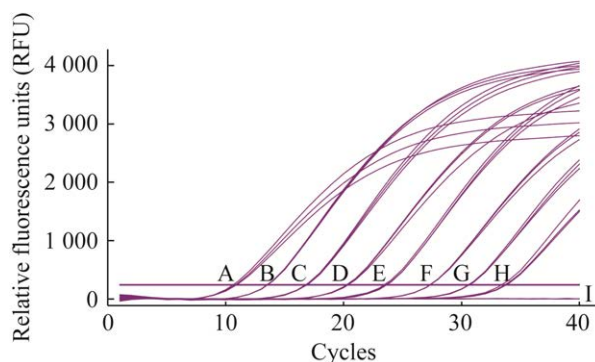


图5 实时荧光定量PCR标准曲线扩增曲线

Figure 5 Real-time fluorescence quantitative PCR standard curve amplification curves. A-H: $5\times 10^8-5\times 10^1$ copies/ μL ; I: Negative control.

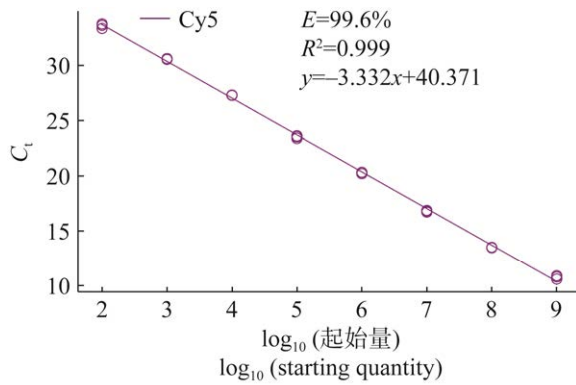


图 6 实时荧光定量 PCR 标准曲线
Figure 6 The standard curve for real-time fluorescence quantitative PCR.

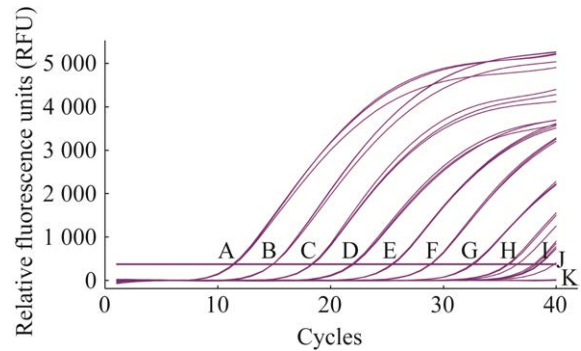


图 7 实时荧光定量 PCR 灵敏度检测扩增曲线
Figure 7 The amplification curves for real-time fluorescence quantitative PCR sensitivity detection. A-J: $5 \times 10^8 - 5 \times 10^{-1}$ copies/ μL ; K: Negative control.

CymRSV 的检测具有较好的重复性和稳定性, 所建立的 RT-qPCR 技术准确性、可靠性高。

2.6 田间抽样检测结果

以优化的体系和条件对 20 个抽检待检样

品进行检测, 阳性对照在 C_t 为 23.31 出现扩增曲线, 阴性对照及样品未出现扩增曲线, 表明抽检的 20 株兰花样品均未携带 CymRSV。同时采用 DAS-ELISA 对该 20 个样品进行复测, 样

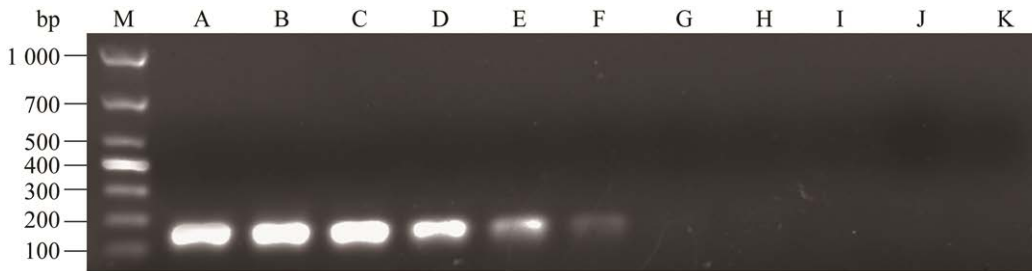


图 8 RT-PCR 灵敏度检测结果
Figure 8 The sensitivity results of RT-PCR detection. A-J: $5 \times 10^8 - 5 \times 10^{-1}$ copies/ μL ; K: Negative control.

表 2 实时荧光定量 PCR 检测体系的重复性试验

Table 2 The repeatability results of the real-time fluorescence quantitative PCR detection

阳性质粒拷贝数 Positive plasmid copy number (copies/ μL)	组内 C_t 值 C_t values within the group			组间 C_t 值 C_t values between the groups		
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数
	Mean	Standard deviation	CV (%)	Mean	Standard deviation	CV (%)
5×10^7	13.50	0.026	0.19	13.44	0.039	0.29
5×10^6	16.82	0.074	0.44	16.76	0.089	0.53
5×10^5	20.27	0.067	0.33	20.14	0.069	0.34
5×10^3	27.30	0.016	0.06	27.19	0.101	0.37
5×10^2	30.58	0.041	0.13	30.57	0.084	0.27

品 OD_{405} 均小于 2 倍空白对照, 检测结果均为阴性, 因此采用本研究建立的 RT-qPCR 方法与 DAS-ELISA 方法检测结果一致。本研究建立的方法可应用于批量样品的 CymRSV 定量高效检测, 特别在脱毒原原种、原种等核心种源的早期 CymRSV 检测方面应用前景广阔。

3 讨论与结论

目前, 随着蝴蝶兰等兰花在全球种质资源交换频率的增加^[24], 病毒病在全球传播趋势越来越严重, 而目前世界上尚未开发出根除病毒病的有效农药, 因此 CymRSV 等病毒病的早发现、早隔离、早治疗非常必要^[25-26]。目前虽然 CymRSV 在我国尚未见报道, 但蝴蝶兰、蕙兰、文心兰和石斛兰等兰花在我国云南、福建、台湾和广东等地均广泛种植, 国内兰科植物中是否携带或传播该病毒尚未可知, 加上 CymRSV 传播途径的多元化, 对兰花产业存在潜在的严重危害。此外, 据 Hollings 等^[1]的报道, CymRSV 常与我国流行侵染兰花的主要危害病毒建兰花叶病毒 CymMV、齿兰环斑病毒 ORSV 复合感染, 复合感染后对植株的伤害更大, 植株受害症状表现更明显、产业损失更高。因此有必要从源头加强对 CymRSV 的监测, 以防范 CymRSV 在国内的发生。

目前已报道的对 CymRSV 的检测和诊断技术主要有传统的症状观察、ELISA 法和 RT-LAMP 等方法, 但症状观察法往往耗时较长, 容易错过病害的最佳防治期, ELISA 法检测灵敏度较低且容易出现假阳性, RT-LAMP 法虽然检测灵敏度较高, 但存在引物设计烦琐和不能定量的问题, 而本研究建立的便捷、灵敏度高、特异性强、能够定量检测 CymRSV 的实时荧光定量 PCR 技术有效地解决了以上难题。

近年来, 实时荧光定量 PCR 技术在植物

病害检测中的应用越来越广泛。王艳娇等^[27]在 2016 年建立的实时荧光定量 PCR 技术能够检出 70 copies/ μL 的柑橘脉突病毒, 检测灵敏度为 RT-PCR 的 100 倍; 赵立群等^[28]2021 年建立的西瓜潜隐病毒实时荧光定量 PCR 技术检测灵敏度可达到 2×10^3 copies, 为 RT-PCR 检测技术的 100 倍; 林兆威等^[29]2021 年建立的槟榔隐症病毒 I 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术检测灵敏度达 30 copies/ μL 级别, 是常规 RT-PCR 敏感性的 100 倍; 贺振等^[30]2020 年建立的实时荧光定量 PCR 技术, 能够检测到 70 copies/ μL 的甘薯潜隐病毒病毒, 其灵敏度是普通 RT-PCR 技术的 100 倍。上述研究均表明实时荧光定量 PCR 检测技术相较于 RT-PCR 技术具有较高的灵敏度和特异性, 且高效便捷可定量, 但与本研究建立的方法相比, 灵敏度差了 10–100 倍, 可能因为前人研究采用的方法(相对/绝对定量)、引物探针组合设计、体系优化的差异导致灵敏度的偏低。

扩增效率 E 在 90%–110% 之间较为理想^[31]。本研究建立的基于 TaqMan 探针法的 CymRSV 实时荧光定量 PCR 检测方法, 标准曲线 $y = -3.332x + 40.371$, 扩增效率 E 为 99.6%, 线性趋势 R^2 为 0.999, 检测灵敏度最高达 1 copy, 稳定检出灵敏度为 5 copies, 是 RT-PCR 检测技术的 10^3 – 10^4 倍, 说明本研究建立的方法体系、条件设计及优化效果较好, 检测灵敏度、检出效率高, 可定量检测出样品 CymRSV 病毒的含量, 且具有较高的稳定性和重复性, 对预测及监测 CymRSV 始发期意义较大, 有利于早发现、早隔离、早预防 CymRSV, 达到及时有效地控制该病毒病害的发生和蔓延, 可为开展兰花 CymRSV 病毒精准检测与科学防控提供技术支撑, 特别在进出口通关检疫、原原种及原种等核心材料的病毒监测领域应用前景广阔。本研

究仅对开远一地的不同兰花种属的 20 个样品开展了抽检应用, 抽检地点及数量均相对局限, 下一步将持续以本研究所建立的方法体系对不同产地、不同种属的兰花样品开展 CymRSV 监测, 为助力兰花种业健康发展、打好种业翻身仗、提升兰花品质和预防兰花病毒病害传播发挥技术支持。

REFERENCES

- [1] HOLLINGS M, STONE OM. Cymbidium ringspot virus (a previously undescribed virus)[R]. Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute, 1963: 146.
- [2] HOLLINGS M, STONE OM. Cymbidium ringspot virus[R]. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 1977: 178.
- [3] 陈金枝, 江芬兰. Cymbidium ringspot virus 核酸及血清检测法之建立及其应用[J]. 台湾(中国)农业研究, 2017, 66(3): 202-218.
CHEN JZ, JIANG FL. Establishment and application of cymbidium ringspot virus nucleic acid and serum test method[J]. Taiwan (China) Agricultural Research, 2017, 66(3): 202-218 (in Chinese).
- [4] 明艳林, 郑金龙, 郑国华, 郑志忠. 兰花抗病毒基因工程研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 92-96.
MING YL, ZHENG JL, ZHENG GH, ZHENG ZZ. Progress on anti-virus genetic engineering of orchid[J]. Subtropical Plant Science, 2010, 39(1): 92-96 (in Chinese).
- [5] KHENTRY Y, PARADORNWAT A, TANTIWIWAT S, PHANSIRI S, THAVEECHAI N. Incidence of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in Dendrobium spp. in Thailand[J]. Crop Protection, 2006, 25(9): 926-932.
- [6] 涂小云, 董小艳, 郭春梅, 何俊平, 鲍恩亚. 多重 RT-PCR 检测蝴蝶兰 3 种病毒 CymMV、ORSV 和 CMV[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 91-93.
TU XY, DONG XY, GUO CM, HE JP, BAO EY. CymMV, ORSV and CMV were detected by multiple RT-PCR[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 91-93 (in Chinese).
- [7] KIM SJ, PARK YH, PARK KT. Development of a novel reverse transcription PCR and its application to field sample testing for feline calicivirus prevalence in healthy stray cats in Korea[J]. Journal of Veterinary Science, 2020, 21(5): e71.
- [8] STRECK AF, RÜSTER D, TRUYEN U, HOMEIER T. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 193(1): 6-8.
- [9] DIGANGI BA, GRAY LK, LEVY JK, DUBOVI EJ, TUCKER SJ. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2011, 13(12): 912-918.
- [10] SCHAAD NW, FREDERICK RD, SHAW J, SCHNEIDER WL, HICKSON R, PETRILLO MD, LUSTER DG. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41: 305-324.
- [11] 黄小武, 杜倩, 闭璟珊, 韦正吉, 邹联斌, 赵子欣, 闫修魁, 韩知晓, 辛佳亮, 郑敏. PCV4 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(10): 109-113.
HUANG XW, DU Q, BI JS, WEI ZJ, ZOU LB, ZHAO ZX, YAN XK, HAN ZX, XIN JL, ZHENG M. Establishment and application of SYBR green I real-time PCR for detection of PCV₄[J]. China Animal Health Inspection, 2020, 37(10): 109-113 (in Chinese).
- [12] 高艳玲, 范国权, 程胜群, 张威, 邱彩玲, 申宇, 聂先舟, 白艳菊, 吕文河. 苜蓿花叶病毒 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测技术体系的建立与应用[J]. 植物保护学报, 2022, 49(2): 515-527.
GAO YL, FAN GQ, CHENG SQ, ZHANG W, QIU CL, SHEN Y, NIE XZ, BAI YJ, LV WH. Establishment and application of RT-PCR and RT-qPCR detection technology system for alfalfa mosaic virus[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2022, 49(2): 515-527 (in Chinese).
- [13] 王瑛丽, 王琴, 刘莹洁, 杨真, 李雪燕, 周彦. 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[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 931-932.
WANG YL, WANG Q, LIU YJ, YANG Z, LI XY, ZHOU Y. Establishment and application of quantitative real-time PCR detection system for citrus chlorotic dwarf virus[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2019, 46(4): 931-932 (in Chinese).

- [14] 秦子禹, 孙建设, 王娜, 邵建柱. 苹果茎痘病毒 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 园艺学报, 2015, 42(7): 1400-1408.
QIN ZY, SUN JS, WANG N, SHAO JZ. Development of a TaqMan real-time RT-PCR method for detecting apple stem pitting virus (ASPV)[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(7): 1400-1408 (in Chinese).
- [15] 卢美欢, 李利军, 马英辉, 王晓兵, 郭邦利, 王晓娥. 魔芋软腐病病原菌 TaqMan 荧光探针 PCR 技术的建立及应用[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1100-1109.
LU MH, LI LJ, MA YH, WANG XB, GUO BL, WANG XE. Establishment and application of TaqMan fluorescence probe real-time PCR detection for the pathogen of konjac soft rot[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(5): 1100-1109 (in Chinese).
- [16] 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[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 929-930.
LEI CY, LOU BH, SONG YQ, CHEN AJ, HE JJ, LIU P. 2019. Establishment of PCR detection for *Pseudocercospora vitis*[J]. Acta Phytomycol Sinica, 2019, 46(4): 929-930 (in Chinese).
- [17] 王柱华, 王文鹏, 袁恩平, 苏帆, 毛清源, 万琼莲, 蔡红. 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[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 429-440.
WANG ZH, WANG WP, YUAN EP, SU F, MAO QY, WAN QL, CAI H. Identification of *Camptotheca acuminata* witches'-broom phytoplasma and TaqMan-based fluorescence qPCR method for detection[J]. Acta Phytomycol Sinica, 2021, 51(3): 429-440 (in Chinese).
- [18] 宋志强, 王暄, 林宇, 迟元凯, 鞠玉亮, 李红梅. 土壤中南方根结线虫的实时荧光 PCR 检测和定量[J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 255-260.
SONG ZQ, WANG X, LIN Y, CHI YK, JU YL, LI HM. 2013. Real-time PCR detection and quantification of southern meloidogyne[J]. Acta Phytomycol Sinica, 2013, 40(3): 255-260 (in Chinese).
- [19] UEHARA-ICHIKI T, URAYAMA SI, HIRAI M, TAKAKI Y, NUNOURA T, FUJINAGA M, HANADA K. Complete genome sequence of Sitke (Sitke) waterborne virus, a member of the genus *Tombusvirus*[J]. Archives of Virology, 2021, 166(3): 991-994.
- [20] MEDZIHRADSZKY A, GYULA P, SÓS-HEGEDŰS A, SZITTYA G, BURGYÁN J. Transcriptome reprogramming in the shoot apical meristem of CymRSV-infected *Nicotiana benthamiana* plants associates with viral exclusion and the lack of recovery[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(12): 1748-1758.
- [21] DONAIRE L, BURGYÁN J, GARCÍA-ARENAL F. RNA silencing may play a role in but is not the only determinant of the multiplicity of infection[J]. Journal of Virology, 2015, 90(1): 553-561.
- [22] SHAHZAD GIR, PASSERA A, MALDERA G, CASATI P, MARCELLO I, BIANCO PA. Biocontrol potential of endophytic plant-growth-promoting bacteria against phytopathogenic viruses: molecular interaction with the host plant and comparison with chitosan[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 6990.
- [23] 王丽花, 农爱仙, 孙爱青, 许凤, 张丽芳, 张艺萍, 杨秀梅. 云南月季根癌病的病原菌鉴定及生物防治技术研究[J]. 江西农业学报, 2022, 34(7): 86-91.
WANG LH, NONG AX, SUN AQ, XU F, ZHANG LF, ZHANG YP, YANG XM. Study on pathogen identification and biological control technology of rose grown gall disease in Yunnan[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2022, 34(7): 86-91 (in Chinese).
- [24] KOH KW, LU HC, CHAN MT. Virus resistance in orchids[J]. Plant Science, 2014, 228: 26-38.
- [25] HUANG XY, QIN Q, XIE ZX. Study on the status quo of *Phalaenopsis*[J]. Agricultural Research and Application, 2018, 174(1): 46-51.
- [26] GUO Y, LIN ZK, LIU LQ. Molecular identification of *Phalaenopsis* mosaic virus infected with *Phalaenopsis* in Xiamen[J]. Subtropical Plant Science, 2011, 40(3): 1-3.
- [27] 王艳娇, 崔甜甜, 黄爱军, 陈洪明, 李中安, 周常勇, 宋震. 柑橘脉突病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测体系的建立与应用[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1613-1620.
WANG YJ, CUI TT, HUANG AJ, CHEN HM, LI ZA, ZHOU CY, SONG Z. Development and application of a quantitative RT-PCR approach for quantification of *Citrus* vein enation virus[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(8): 1613-1620 (in Chinese).
- [28] 赵立群, 邱艳红, 张晓飞, 刘慧, 杨静静, 张建, 张海军, 徐秀兰, 温常龙. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 检测西瓜潜隐病毒[J]. 中国农业科学, 2021, 54(20): 4337-4347.

- ZHAO LQ, QIU YH, ZHANG XF, LIU H, YANG JJ, ZHANG J, ZHANG HJ, XU XL, WEN CL. The detection of *Citrullus lanatus* cryptic virus using *TaqMan*-qPCR method[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(20): 4337-4347 (in Chinese).
- [29] 林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 宋薇薇, 孟秀丽, 覃伟权. 槟榔隐症病毒 1 型 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *热带作物学报*, 2021, 42(11): 3087-3092.
- LIN ZW, NIU XQ, TANG QH, SONG WW, MENG XL, QIN WQ. Development of a *TaqMan* real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Areca* palm *Velarivirus 1*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(11): 3087-3092 (in Chinese).
- [30] 贺振, 董婷婷, 吴伟文, 陈雯, 李良俊. 莲藕中甘薯潜隐病毒实时荧光定量 PCR 检测技术的建立及应用[J]. *园艺学报*, 2020, 47(7): 1412-1420.
- HE Z, DONG TT, WU WW, CHEN W, LI LJ. Development and evaluation of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of sweet potato latent virus-lotus in lotus plants[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(7): 1412-1420 (in Chinese).
- [31] EUN AJC, SEOH ML, WONG SM. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the *TaqMan*® real-time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 87(1/2): 151-160.