

斯里兰卡木薯花叶病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

黄境珊^{1,2}, 王国芬², 时涛², 李超萍², 陈奕鹏², 蔡吉苗², 李博勋², 刘先宝², 黄贵修^{2,3*}

1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572024

摘要: 由斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 侵染引起的斯里兰卡木薯花叶病是近年来我国木薯种植中新发的危险性病害。现有检测技术存在灵敏度低、效率不高等不足, 限制了相关工作的开展。本研究根据病毒基因序列设计引物和探针, 制备阳性质粒标准品, 建立 SLCMV 的 TaqMan 荧光定量检测技术, 并对其应用效果等进行验证。结果发现, 该方法仅对 SLCMV DNA 样品产生特异性荧光信号, 对阳性质粒标准品的最低检出量为 4.5×10^1 copies/ μ L。标准曲线显示, C_t 值与拷贝数的对数呈良好线性关系, 曲线斜率为 -3.1312, 相关系数 (R^2) 为 0.9969, 扩增效率 (E) 为 97.9%, 标准曲线方程为 $y = -3.1312x + 34.599$ 。利用该技术对广西和福建的 2 个木薯种植园供试样品进行检测, 叶片阳性检出率分别达 95.45% 和 78.57%, 最低检测拷贝数为 1.45×10^5 copies/g, 而田间烟粉虱携毒率为 86%, 最低带毒量为 9.42×10^4 copies/头。该技术具有良好的灵敏度、特异性和重复性, 可为该病的田间鉴定、早期诊断、无毒种茎评价等监控工作提供有效的技术支持。

关键词: 木薯; 斯里兰卡木薯花叶病毒; TaqMan 荧光定量 PCR

中图分类号: S435.33 文献标志码: A

Establishment and Application of TaqMan Fluorescence Quantitative PCR (TaqMan qPCR) Detection Method of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus

HUANG Jingshan^{1,2}, WANG Guofen², SHI Tao², LI Chaoping², CHEN Yipeng², CAI Jimiao², LI Boxun², LIU Xianbao², HUANG Guixiu^{2,3*}

1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / State Key Laboratory of Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Sri Lankan cassava mosaic disease, caused by *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), is a recently emerging dangerous disease in China. Existing detection methods of SLCMV are constrained by low sensitivity and poor efficiency, impeding related research and applications. Primers and probes were designed according to the gene sequences of the SLCMV, and a positive plasmid standard was prepared. The TaqMan fluorescence quantitative detection technology

收稿日期 2025-04-01; 接受日期 2025-05-22

基金项目 国家木薯产业技术体系病害防控岗 (No. CARS-11-HNHGX); 热带作物生物育种全国重点实验室热带专项创新团队项目 (No. NKLTCBCXTD32); 国家重点研发计划项目 (No. 2020YFD1000600)。

作者简介 黄境珊 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 黄贵修 (HUANG Guixiu), E-mail: hgxiu@vip.163.com。

for SLCMV was established, and its application effect was verified. The method only generated specific fluorescence signals for SLCMV DNA samples, and the minimum detectable amount of the positive plasmid standard was 4.5×10^1 copies/ μ L. The standard curve showed that there was a good linear relationship between the C_t value and the logarithm of the copy number. The slope of the curve was -3.1312 , the correlation coefficient R^2 was 0.9969 , the amplification efficiency (E) was 97.9% , and the equation of the standard curve was $y = -3.1312x + 34.599$. Using this technology to detect the tested samples from two cassava plantations in Guangxi and Fujian, the positive detection rate of leaves was 95.45% and 78.57% , respectively, and the minimum detectable copy number was 1.45×10^5 copies/g. The virus-carrying rate of *Bemisia tabaci* in the field was 86% , and the minimum virus-carrying amount was 9.42×10^4 copies/*B. tabaci*. This technology has good sensitivity, specificity, and repeatability, and could provide effective technical support for the monitoring and control work such as field identification, early diagnosis, and evaluation of virus-free stem cuttings of the disease.

Keywords: cassava; *Sri Lankan cassava mosaic virus*; TaqMan qPCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.003

木薯 (*Manihot esculenta*) 属于大戟科木薯属, 原产于南美洲亚马孙平原南部边缘, 目前在热带和部分亚热带地区广泛种植。木薯块根肉质, 富含淀粉, 被誉为“淀粉之王”“地下粮仓”, 与马铃薯、甘薯并称为世界三大薯类, 也是全球第六大粮食作物。木薯在我国华南地区广泛种植, 鲜薯收获后, 除少量直接鲜食或饲用外, 主要用作工业原料, 可加工出多达 3000 种产品, 覆盖人民生活的各个领域^[1]。目前, 广西是国内木薯最大的种植区域, 海南、广东等地区也是重要的种植区^[2]。

斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 属于双生病毒科 (Geminiviridae) 菜豆金黄花叶病毒属 (*Begomovirus*), 是已知 11 种木薯花叶双生病毒 (*Cassava Mosaic geminiviruses*, CMGs) 中的一种。SLCMV 侵染后, 首先在发病叶片部分部位出现褪绿、黄化, 随后扩大且出现类似“花叶”的症状, 典型症状为叶片黄化、皱缩畸形及斑驳等症状。SLCMV 主要通过带毒种茎进行远距离传播^[3], 田间条件下主要通过烟粉虱进行短距离扩散^[4]。该病毒引起的斯里兰卡木薯花叶病毒病 (*Sri Lankan cassava mosaic disease*, SLCMD) 是亚洲地区重要的木薯病害, 近年来在东南亚地区的木薯园内发生严重为害^[5]。2018 年, 本团队首次在海南儋州和澄迈发现该病害^[6], 随后调查发现该病在主要种植区均有零星发生, 已经成为国内木薯种植业及相关产业发展的潜在威胁。

SLCMV 的早期检测对于病害的田间防控工作具有重要的指导意义。王国芬等^[7]初步建立了 SLCMV 的常规检测技术, 周司珊^[8]进一步开展了

巢式 PCR 检测技术的研究和应用工作。AYAKA 等^[9]、ARUTSELVAN 等^[10]先后开展了 SLCMV 的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测技术研究, 并获得灵敏度比常规方法高 100 倍的效果。SLCMD 为我国木薯新发病害, 常规 PCR 和巢式 PCR 检测方法存在灵敏度低、效率不高等不足, 而 LAMP 技术常获得假阳性结果^[10], 对于新发病害并不适用。因此, 本研究基于 SLCMV 外壳蛋白 AV1 基因保守序列, 设计引物和探针, 开展 TaqMan 荧光定量 PCR (TaqMan qPCR) 检测技术的研发工作, 旨在为该病害的早期诊断和有效防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 木薯叶片样品由本团队于 2024 年分别在广西壮族自治区北海市合浦县和福建省大田县发病木薯园内, 采集出现异常褪绿、花叶等症状的 SLCMD 疑似病叶, 同时在附近无病薯园内收集无病叶片。烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 样品于 2024 年采集于广西壮族自治区北海市铁山港区发病薯园。木薯无病叶片基因组 DNA、木薯普通花叶病毒 (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV) cDNA、木薯细菌性萎蔫病菌 (*cassava bacterial blight*, CBB) 基因组 DNA、SLCMV 重组质粒标准品 (载体为 pMD 18-T vector, 克隆有该病毒外壳蛋白 AV1 编码序列, GenBank 登录号为 WCR23751) 等均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 Ex Taq 酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、pMD 18-T Vector、质粒提

取试剂盒、实时荧光定量 PCR (探针法) 试剂盒等分别购自宝生物工程 (大连) 有限公司和天根生化科技 (北京) 有限公司; 荧光探针、引物由深圳华大基因科技有限公司合成。所用主要仪器为 qTower 3G 实时荧光定量 PCR 仪, 购自德国椰拿分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品总 DNA 提取 参考王国芬等^[7]和何海芳^[11]的方法, 分别提取木薯叶片、单头烟粉虱

总 DNA, 方法略有改进, 每 0.1 g 叶片及每头烟粉虱的 DNA 样品分别用 50 μ L 和 30 μ L 去离子水进行溶解。

1.2.2 引物与探针设计与合成 参照周司珊^[8]的方法, 合成引物对 SL12/SL13 和 CP1F/CP1R (表 1) 进行样品的巢式 PCR 检测。基于 SLCMV 外壳蛋白 AVI 基因保守序列, 设计特异性引物 SLCMV-QF638/SLCMV-QR699 和探针 Probe-661 (表 1), 用于 TaqMan qPCR 研究。

表 1 SLCMV 引物与探针序列

Tab. 1 Primers and probe sequences of Sri Lankan cassava mosaic virus

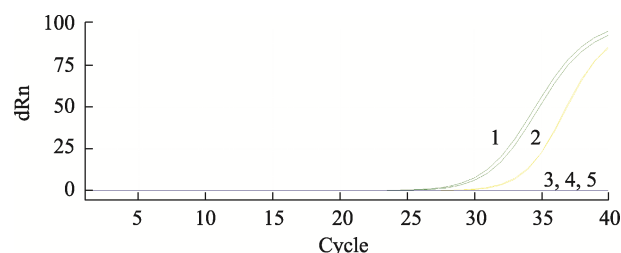
引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物长度 Length of amplification product/nt	用途 Purpose
SL12	CACGGTTTCCGGTGTATGCT	1058	SLCMV nested PCR detection
SL13	CCTGGCGTTTCTTGAGGGTAT		
CP1F	AACTTCGACAGCCCATACAG	287	
CP1R	AGGATATAAACGGACTTAACGC		
SLCMV-QF638	AGCAAGAGGCTGGCAAGTATGA	62	TaqMan qPCR detection
SLCMV-QR699	ACACGCCATGTACAGCATCAA		
Probe-661	AATCATACCGAGAATGC	17	

1.2.3 TaqMan qPCR 引物验证 随机选取 2 份 SLCMD 阳性样品和 2 份无病木薯样品 DNA (阴性对照), 以 ddH₂O 为空白对照, 参照林兆威等^[12]的方法, 用 SLCMV-QF638/SLCMV-QR699 引物对和探针 Probe-661 进行 TaqMan qPCR。

1.2.4 阳性质粒标准品的制备及灵敏度、特异性与重复性验证 参考林兆威等^[12]的方法进行阳性质粒标准品的制备。以感染斯里兰卡木薯花叶病毒病 (SLCMV) 的木薯叶片 DNA 为阳性对照, 以木薯无病叶片基因组 DNA、木薯普通花叶病毒 cDNA、木薯细菌性萎蔫病菌基因组 DNA、无菌水等为阴性对照进行特异性试验。以不同浓度梯度的阳性质粒标准品为模板进行灵敏度和重复性验证。各处理重复 3 次。

1.2.5 田间样本检测 选取分别来自广西壮族自治区北海市合浦县和福建省大田县发病木薯园的疑似 SLCMD 样品, 以及来自北海市铁山港区的烟粉虱样品, 分别进行巢式 PCR 和 TaqMan qPCR 检测, 并计算其拷贝数区间。

和 2 份无病阴性样品的基因组为模板, 以 ddH₂O 为空白对照, 利用引物 SLCMV-QF638/SLCMV-QR699 和探针 Probe-661 进行 TaqMan qPCR 扩增。阴性样品和空白对照未产生扩增产物, 呈一条直线, 而 2 份阳性样品的扩增产物浓度均出现指数增长, 表现为“S”形扩增曲线。试验结果表明所设计的引物/探针组合能有效检测到 SLCMV, 可进行进一步研究 (图 1)。



1~2: SLCMD 样品; 3~4: 阴性对照; 5: 空白对照。
1-2: SLCMD samples; 3-4: Negative control;
5: Blank control.

图 1 引物和探针验证

Fig. 1 Verification of primer pairs and probes

2 结果与分析

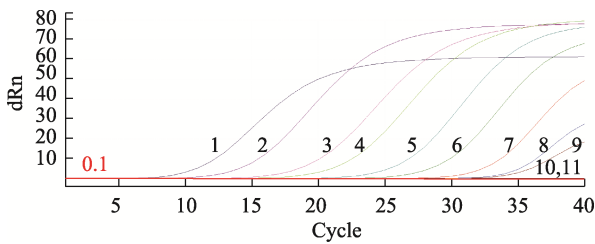
2.1 荧光定量 PCR 引物验证

随机选取 2 份具有 SLCMD 典型症状阳性样品

2.2 灵敏度试验与标准曲线的建立

SLCMV 重组质粒提取后, 用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测其质量浓度为 38.5 ng/ μ L,

$A_{260/280}$ 比值为 1.79，换算成拷贝数为 4.5×10^{10} copies/ μL 。以阳性质粒标准品 $4.5 \times 10^9 \sim 4.5 \times 10^0$ copies/ μL 等 10 个浓度梯度为模板，无病木薯样品为阴性对照，用本研究设计的引物对和探针进行 TaqMan qPCR。当质粒浓度在 4.5×10^1 copies/ μL 以上时，该反应体系均可检出（图 2）。标准曲线表明 C_t 值与拷贝数的对数呈良好的线性关系，斜率为 -3.1312，相关系数 (R^2) 为 0.9969，扩增效率 (E) 为 97.9%，其标准曲线方程为 $y = -3.1312x + 34.599$ （图 3）。



1~10: $4.5 \times 10^9 \sim 4.5 \times 10^0$ copies/ μL ; 11: 阴性对照。
1-10: $4.5 \times 10^9 \sim 4.5 \times 10^0$ copies/ μL ; 11: Negative control.

图 2 TaqMan qPCR 扩增反应体系灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity tests of TaqMan qPCR amplification reaction system

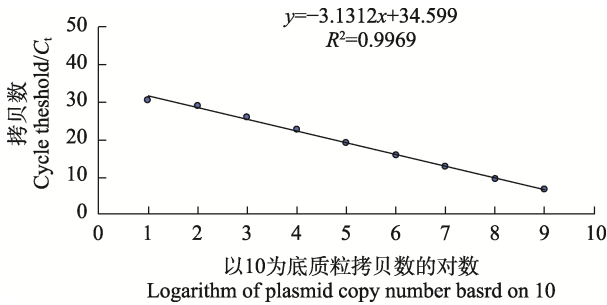


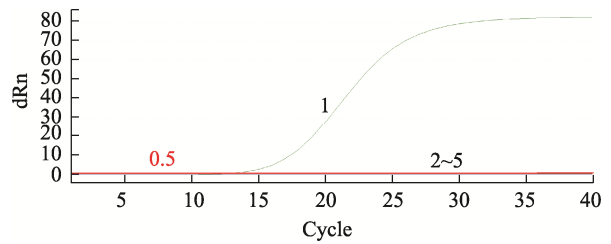
图 3 TaqMa qPCR 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of TaqMan qPCR

2.3 特异性试验

以无菌水为空白对照 (blank control, BC),

无病叶片 (disease-free leaves, DFL) 的基因组 DNA、木薯普通花叶病毒 cDNA 和木薯细菌性萎蔫病菌基因组 DNA 等为阴性对照进行 SLCMV 的 TaqMan qPCR 检测。结果仅 SLCMV 出现扩增曲线，空白对照、木薯无病叶片的基因组 DNA、木薯普通花叶病毒 cDNA、木薯细菌性萎蔫病菌基因组 DNA 等样品均未获得扩增产物 (图 4)，表明该方法对 SLCMV 的检测效果具有良好的特异性，无病木薯组织及 2 种常见病害均不会对本检测方法产生非特异性干扰。



1: SLCMV; 2~5: 空白对照、无病叶片的基因组 DNA、木薯普通花叶病毒、木薯细菌性萎蔫病菌。

1: SLCMV; 2~5: BC, DFL, CsCMV, CBB.

图 4 TaqMan qPCR 特异性检测

Fig. 4 TaqMan qPCR specific detection

2.4 重复性验证

分别制备浓度为 4.5×10^6 、 4.5×10^7 、 4.5×10^8 、 4.5×10^9 copies/ μL 的阳性质粒标准品，以其为模板进行 TaqMan qPCR 的组内、组间的重复性和稳定性评价。组内重复性试验结果表明， C_t 值的变异系数为 0.53%~0.84%。以相同的试验条件，对每个稀释浓度分别进行 3 次独立的重复性试验，结果表明 C_t 值的变异系数为 0.67%~1.58%。组内变异系数小于 1%，而组间变异系数小于 2%，表明建立的 TaqMan qPCR 方法的重复性和稳定性较好 (表 2)。

表 2 TaqMan qPCR 重复性验证

Tab. 2 Repeatability verification of TaqMan qPCR

标准品拷贝数 Standard copy number/(copies· μL^{-1})	组内重复性试验 Intra-group repeat test		组间重复性试验 Inter-group repeat test	
	平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%	平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%
4.5×10^6	33.72±0.18	0.53	34.18±0.37	1.08
4.5×10^7	33.41±0.28	0.84	32.62±0.52	1.58
4.5×10^8	30.79±0.25	0.81	30.55±0.34	1.11
4.5×10^9	28.42±0.22	0.77	28.28±0.19	0.67

2.5 田间样本检测

随机选取分别来自广西合浦和福建大田的病样，利用本试验建立的 TaqMan qPCR 和巢式 PCR

技术分别进行检测。巢式 PCR 检测结果显示，广西合浦田间 22 份样品中有 7 份为阳性，而 TaqMan qPCR 检测出 21 份阳性。福建大田样品用巢式

PCR 检测出 11 份为阳性, 而 TaqMan qPCR 检测出 14 份阳性。相关结果表明, TaqMan qPCR 检出率显著高于巢式 PCR 技术, 这与该方法灵敏度更高一致。计算其最低和最高拷贝数, 得出其阳性的病毒拷贝数, 合浦地区木薯样品病毒拷贝数

在 $1.43 \times 10^5 \sim 4.09 \times 10^{11}$ copies/g 之间, 而福建大田木薯样品病毒拷贝数在 $6.70 \times 10^5 \sim 1.88 \times 10^9$ copies/g 之间 (表 3)。

在广西北海铁山港区发病木薯园随机选择 14 株受害植株, 各抓取 1 头烟粉虱, 提取基因组 DNA

表 3 巢式 PCR 和 TaqMan qPCR 对木薯样品的检测结果
Tab. 3 Detection of cassava samples by Nested PCR and TaqMan qPCR

样品编号 Sample No.	品种/种质 Variety/Germplasm	来源 Origin	巢式 PCR Nested PCR	TaqMan qPCR	拷贝数 Copy number/copies·g ⁻¹
HP24101	桂热 13	广西合浦	-	+	1.16×10^6
HP24102	6068		-	+	9.04×10^5
HP24103	NZ199		-	+	6.45×10^5
HP24104	沙田面包		-	+	7.40×10^5
HP24105	SC205		-	+	6.10×10^5
HP24106	实生 5 号		+	+	2.00×10^8
HP24107	实生 1 号		+	+	2.15×10^6
HP24108	V04-19		-	+	6.55×10^5
HP24109	华南 9		-	+	1.53×10^6
HP24110	桂热 10		-	+	2.22×10^7
HP24111	YB201		-	+	7.10×10^7
HP24112	A09-24		-	+	5.00×10^8
HP24113	RXC09		-	-	0
HP24114	V06-31		-	+	1.06×10^6
HP24115	面包木薯		-	+	1.43×10^5
HP24116	杂 NK-10		+	+	4.09×10^{11}
HP24117	NK-10-8		+	+	4.19×10^8
HP24118	实生 5 号		+	+	1.35×10^8
HP24119	NK-10-1		+	+	3.98×10^{11}
HP2420	YB201		+	+	7.25×10^7
HP2421	TCGRI028		-	+	1.56×10^7
HP2422	桂 11		-	+	1.96×10^6
DT2401	F499	福建大田	+	+	1.78×10^6
DT2402	GR911		-	+	6.70×10^5
DT2403	沙田		-	-	0
DT2404	A05-138		-	+	2.57×10^8
DT2405	C		+	+	3.11×10^6
DT2406	YB69		+	+	1.14×10^8
DT2407	NZ199		+	+	5.04×10^8
DT2408	V4-8		+	+	1.32×10^7
DT2409	49		+	+	3.04×10^8
DT2410	NZ199		+	+	7.00×10^8
DT2411	V4-8		+	+	1.88×10^9
DT2412	49		+	+	1.01×10^6
DT2413	NZ199		+	+	3.37×10^8
DT2414	A		+	+	3.69×10^8

注: “+”表示阳性;“-”表示阴性。

Note: “+” indicates positive; “-” indicates negative.

后应用 TaqMan qPCR 方法对营盘镇田间疑似 SLCMV 感染的木薯烟粉虱种群进行单头定量检测。结果表明, 12 头烟粉虱携带有 SLCMV, 比例为 85.71%, 其 C_t 值均低于 23.65, 而单头烟粉虱携带病毒数量在 $9.42 \times 10^4 \sim 2.33 \times 10^9$ copies/头之间 (表 4)。

表 4 TaqMan qPCR 对单头烟粉虱样品的检测结果

Tab. 4 Test results of TaqMan qPCR on single *B.tabaci* samples 单位: copies/头

样品编号 Sample No.	拷贝数 Copy number	样品编号 Sample No.	拷贝数 Copy number
Bt241201	3.03×10^5	Bt241208	0
Bt241202	2.34×10^6	Bt241209	3.48×10^6
Bt241203	9.42×10^4	Bt241210	5.13×10^7
Bt241204	1.461×10^5	Bt241211	2.33×10^9
Bt241205	0	Bt241212	1.641×10^9
Bt241206	5.79×10^5	Bt241213	1.545×10^9
Bt241207	2.898×10^5	Bt241214	6.285×10^5

3 讨论

在植物病毒快速检测方法研发中, 灵敏度和特异性是主要考虑的因素。TaqMan qPCR 具有很高的灵敏度, 可检测低至几个拷贝的病毒核酸, 尤其适用于早期感染或低浓度病原物的检测。在甘薯双生病毒^[13]、番茄褪绿病毒^[14]、香蕉线条病毒^[15]和柑橘褪绿矮缩病毒^[16]等的检测中, TaqMan qPCR 比常规 PCR 的灵敏度高 100 倍, 同时对一些难于分离和核酸提取的微量病原物, 如槟榔黄化植原体和槟榔隐症病毒 1 型, 具有明显的优势^[12]。在特异性方面, TaqMan qPCR 利用上下游引物和中间探针进行双重验证, 使其特异性更强, 有效避免非特异性扩增, 减少了假阳性结果。探针法的优势还在于能对样品进行定量和定性分析, 通过标准曲线可精确计算病毒载量, 为病害流行病学研究提供数据支持。检测过程完全封闭减少交叉污染, 且后续无需处理, 进一步提高检测工作的效率。

在我国, 木薯主要病害的早期感染症状具有较高的相似性。木薯普通花叶病由木薯普通花叶病毒 (属于 RNA 病毒) 侵染引起, 受害叶片同样形成和 SLCMD 相似的“花叶状”^[7], 仅能通过分子检测才能确认。细菌性萎蔫病是我国木薯种植中为害最严重的病害, 发病叶片最初同样出现相似的褪绿症状, 只有症状充分形成后才能够准

确识别。因此, 病害的早期诊断, 一直是监控工作中的难题。传统的田间识别方法依赖典型症状的识别, 往往延误防控时机。此外, 田间条件下, 常存在多种病原的复合侵染现象, 进一步增加了诊断难度。本研究建立的 TaqMan qPCR 技术针对木薯花叶病毒 (SLCMV) 的保守序列设计引物和探针, 通过优化反应条件 (如退火温度、引物浓度等), 可实现对木薯组织、烟粉虱等的 SLCMV 精准检测, 且具有良好的特异性。另外, 周司珊^[8]发现巢式 PCR 的灵敏度比常规 PCR 高 100 倍。与巢式 PCR 相比, 本研究建立的 TaqMan qPCR 技术, 灵敏度进一步提高了 10 倍, 从而有助于实现病害的早期精准诊断, 2 种方法的田间检测结果也证明了这一点。此外, 本技术还实现了对病毒传播媒介烟粉虱的携毒检测, 从而能够有效监测田间带毒介体数量, 为该病害的早期预警和综合防控提供技术支持。

4 结论

SLCMD 是国际木薯危险性病害, 本研究成功建立一种基于 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR 方法, 用于检测斯里兰卡木薯花叶病毒 (SLCMV)。该方法具有高灵敏度、强特异性和良好的重复性, 能够有效检测 SLCMV 的早期感染。和常规 PCR 相比, 该方法检测效率提高 1000 倍, 也比巢式 PCR 高 10 倍。标准曲线显示, C_t 值与拷贝数的对数之间呈现良好的线性关系, 扩增效率为 97.9%, 标准曲线方程为 $y = -3.1312x + 34.599$ 。特异性研究表明该方法仅能针对 SLCMV 进行有效扩增, 无病叶片、木薯普通花叶病等病原均不能获得扩增产物。田间应用表明, 该方法可有效提高病毒样品的检出率, 能够为该病的田间鉴定、早期诊断、无毒种茎评价等监控工作提供有效的技术支持, 有望在该病田间监控工作中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 古碧, 李开绵, 张振文, 谢彩锋, 李凯. 我国木薯加工产业发展现状及发展趋势[J]. 农业工程技术(农产品加工业), 2013, 11: 25-31.
- GU B, LI K M, ZHANG Z W, XIE C F, LI K. Current development status and future trends of cassava processing industry in China[J]. Agricultural Engineering Technology (Agricultural Product Processing Industry), 2013, 11: 25-31.

- (in Chinese)
- [2] 杨梅琼. 广西木薯产业发展形势与对策建议[J]. 农业研究与应用, 2020, 33(6): 74-77.
YANG M Q. Development situation of Guangxi's cassava industry and its counter measures[J]. Journal of Agricultural Research and Application, 2020, 33(6): 74-77. (in Chinese)
- [3] MINATO N, SOK S, CHEN S, DELAQUIS E, PHIRUN I, LE V X, BURRA D D, NEWBY J C, WYCKHUYS K A G, DE H S. Surveillance for Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in Cambodia and Vietnam one year after its initial detection in a single plantation in 2015[J]. PLoS One, 2019, 14: e0212780.
- [4] UKE A, HOAT T X, QUAN M V, UGAK LM, NATSUAKI K T. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Vietnam[J]. Plant Disease, 2018, 102: 2669-2670.
- [5] PADINJAREPULIKKIYIL S H, THULASI R R, MADHAVI N S, THANGARAJ M. Cassava mosaic disease in South and Southeast Asia: current status and prospects[J]. Frontiers, 2023, 27(6): 10.3389.
- [6] 时涛, 王国芬, 李超萍, 林兆威, 黄贵修. 木薯花叶病在中国发生的首次报道[J]. 热带农业科学, 2018, 38(10): 99-100.
SHI T, WANG G F, LI C P, LIN Z W, HUANG G X. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infected cassava in China[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2018, 38(10): 99-100. (in Chinese)
- [7] 王国芬, 李超萍, 时涛, 周司珊, 李博勋, 蔡吉苗, 林兆威, 黄贵修. 我国木薯花叶病毒病的发生危害及其病原鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1668-1677.
WANG G F, LI C P, SHI T, ZHOU S S, LI B X, CAI J M, LIN Z W, HUANG G X. Distribution and pathogen detection of cassava mosaic virus disease in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(6): 1668-1677. (in Chinese)
- [8] 周司珊. 国内木薯花叶病毒病原鉴定及其疫情监测研究[D]. 海口: 海南大学, 2021.
ZHOU S S. Pathogen identification and the disease epidemic surveillance of cassava mosaic disease in China[D]. Haikou: Hainan University, 2021. (in Chinese)
- [9] AYAKA U, SOPHARY K, KOHEI K, TAKUMA S, OKKYUNG K, TRINH X H, KEIKO T N, MASASHI U. Detection of Sri Lankan cassava mosaic virus by loop-mediated isothermal amplification using dried reagents[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 299: 114336.
- [10] ARUTSELVAN R, MAKESHKUMAR T. Single-tube colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for high-sensitivity detection of SLCMV in cassava from southern India[J]. Microbial Pathogenesis, 2024, 192: 106718.
- [11] 何海芳. 瓜类褪绿黄化病毒与介体烟粉虱互作关系研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
HE H F. The interactions of CCYV with its vector Bemisia Tabaci[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [12] 林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 宋薇薇, 孟秀利, 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 Z W, NIU X Q, TANG Q H, SONG W W, MENG X L, QIN W Q. 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)
- [13] 田雨婷, 赵晓立, 乔奇, 王爽, 秦艳红, 张德胜, 王永江, 张振臣. 甘薯双生病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 江苏师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(3): 35-39.
TIAN Y T, ZHAO X L, QIAO Q, WANG S, QIN Y H, ZHANG D S, WANG Y J, ZHANG Z C. Development and application of real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of sweepoviruses[J]. Journal of Jiangsu Normal University (Natural Science Edition), 2019, 37(3): 35-39. (in Chinese)
- [14] 王吉成, 李洁, 丁天波, 褚栋. 番茄褪绿病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 快速检测方法的建立与应用[J]. 昆虫学报, 2020, 63(2): 159-165.
WANG J C, LI J, DING T B, CHU D. Development and application of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for rapid detection of *Tomato chlorosis virus*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(2): 159-165. (in Chinese)
- [15] 孙洁, 王婉, 饶雪琴, 李华平. 应用 TaqMan real-time PCR 研究 BSV 在带毒香蕉组培苗中传递[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2): 187-196.
SUN J, WANG W, RAO X Q, LI H P. Transmission of banana streak virus in virus-infected banana plantlets using TaqMan real-time PCR[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(2): 187-196. (in Chinese)
- [16] 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 Y L, WANG Q, LIU Y J, YANG Z, LI X Y, ZHOU Y. Establishment and application of a quantitative PCR assay for the detection of Citrus chlorotic dwarf-associated virus[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(4): 931-932. (in Chinese)