

2 种检测兰花黄瓜花叶病毒方法的建立与比较

杜见南¹, 何建升², 黎伟文², 李艳嫦², 吴洁秋¹, 傅海平¹, 李早文¹, 范俊强¹, 谭志勇¹, 徐 匆^{1*}

1. 东莞市农业科学研究中心, 广东东莞 523086; 2. 东莞市大岭山镇农业技术服务中心, 广东东莞 523770

摘要: 黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 是一种可侵染多种单、双子叶植物的病毒, 宿主范围非常广泛。本研究针对兰花中黄瓜花叶病毒建立了 2 种高效检测技术: 反转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和反转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)。RT-qPCR 采用 TaqMan 探针法, 根据外壳蛋白 (coat protein, cp) 基因保守序列设计引物及探针, cp 克隆质粒为标准品建立标准曲线; RT-LAMP 同样以 cp 基因保守区域为模板设计内、外引物; 以 CMV、建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, CymMV)、齿兰环斑病毒 (Odontoglossum ringspot virus, ORSV) 的病毒 RNA 为模板进行 RT-qPCR 及 RT-LAMP 特异性检测; 以 10 倍梯度稀释的 CMV RNA 为模板进行灵敏性检测; 使用 2 种方法对田间兰花样品进行 CMV 感染情况监测。结果显示: 本研究建立的 CMV RT-qPCR、RT-LAMP 检测法仅能检出 CMV 阳性模板, 其余模板检测结果为阴性, 2 种方法均具有特异性; RT-qPCR 与 RT-LAMP 的灵敏度一致, 为原液稀释 10^6 倍; 田间兰花样品的 CMV 阳性植株检出率均为 26.7%。这表明本研究建立的 RT-qPCR 和 RT-LAMP 均具有特异性强、灵敏度高的特点, 且适合在实际生产过程中监测兰花感染 CMV 的情况。

关键词: 兰花; 黄瓜花叶病毒; 外壳蛋白基因; 反转录荧光定量 PCR; 反转录环介导等温扩增

中图分类号: S436.8 文献标志码: A

Establishment and Comparison of Two Methods for Detecting Cucumber Mosaic Virus in Orchid

DU Jiannan¹, HE Jiansheng², LI Weiwen², LI Yanchang², WU Jieqiu¹, FU Haiping¹, LI Zaowen¹, FAN Junqiang¹, TAN Zhiyong¹, XU Cong^{1*}

1. Dongguan Agricultural Science Research Center, Dongguan, Guangdong 523086, China; 2. Dalingshan Agricultural Technology Service Center, Dongguan, Guangdong 523770, China

Abstract: Cucumber mosaic virus (CMV) is a virus that can infect various monocotyledonous and dicotyledonous plants. Two efficient detection methods for CMV in orchids, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) were developed in the study. For RT-qPCR, a TaqMan probe-based assay was designed using conserved regions of the coat protein (cp) gene, with a cloned cp plasmid serving as the standard for calibration curve construction. For RT-LAMP, specific inner and outer primers were designed based on the cp gene conserved sequences too. Both methods specificity detection were performed using virus RNA from CMV, Cymbidium mosaic virus (CymMV), and Odontoglossum ringspot virus (ORSV) as templates, and for sensitivity detection was performed using 10-fold serial dilutions of CMV RNA as a template. Additionally, field-collected orchid samples were screened for CMV infection using both techniques. The CMV RT-qPCR and RT-LAMP detection methods established in this study detected only CMV-positive samples without cross-reactivity with CymMV or ORSV. The sensitivity of RT qPCR and RT LAMP was consistent with a dilution of 10^6 times the original solution. The positive rate of CMV in field orchid samples was 26.7%. The results demonstrate that the RT-qPCR and RT-LAMP established in this study have strong

收稿日期 2025-04-21; 接受日期 2025-05-26

基金项目 东莞市社会科技发展 (重点) 项目 (No. 2020507101164)。

作者简介 杜见南 (1986—), 女, 学士, 农艺师, 研究方向: 观赏植物。*通信作者 (Corresponding author): 徐 匆 (XU Cong), E-mail: 10306967@qq.com。

specificity and high sensitivity, and are suitable for monitoring CMV infection in orchids in actual production processes.

Keywords: Orchid; Cucumber mosaic virus (CMV); coat protein gene; RT-qPCR; RT-LAMP

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.020

兰花具有很高的观赏价值和经济价值。近年来,我国兰花产业发展迅速,但在种植过程中一旦发生病毒感染和传播,可能使产业面临重大风险。除最常见的建兰花叶病毒(Cymbidium mosaic virus, Cym MV)、齿兰轮斑病毒(Odontoglossum ringspot virus, ORSV)外,黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)也被发现能够感染兰花^[1-3]。黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)属于雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*),黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*),在植物病毒中宿主范围最大,居“世界十大植物病毒”的第4位,能够侵染100多科500个属的1300多种植物,是危害蔬菜生产和观赏植物栽培的重要病毒之一^[4-6],主要传播途径有蚜虫、汁液、种子^[7]等。在观赏植物中,CMV可导致叶片镶嵌和扭曲、发育迟缓、颜色断裂和花朵畸形^[5]。每年均有报道新的CMV宿主^[8-9],但是目前对于病毒病的防治手段十分有限,因此对CMV的防控研究主要集中于抗性植物的品种培育^[10-13]及病毒检测方法^[2, 14-16]的建立。兰花病毒检测方法可以分为4类:生物学检测^[17]、电镜观察法^[18-20]、免疫学检测^[20-22]以及分子生物学检测^[23-26]。4类方法中,生物学检测法操作简单,易上手,但弊端突出,如操作环境严格,周期长等;电镜检测取样简单,所需时间短,但对技术要求高,不易上手,电镜价格昂贵;免疫学检测法具有特异性高、耗时短的优点,但需高质量的抗体,容易出现假阴性,且成本较高,不易推广;分子生物学检测法特异性强,灵敏度高,被应用于多种动植物病原体的检测。CMV的分子生物学检测方法多有报道^[27-30],但针对兰花感染CMV的分子生物学检测方法较少。

本研究以感染兰花的CMV *cp* 基因为目的基因建立了一步法RT-qPCR及RT-LAMP检测方法,以便能快速、有效地监测兰花大规模生产中CMV感染情况,减少因CMV引起的经济损失。

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、

齿兰环斑病毒(Odontoglossum ringspot virus, ORSV)、兰花建兰花叶病毒(Cymbidium mosaic virus, CymMV)来自美国Agdia公司及东莞市农业科学研究中心花卉大棚。

RNA提取试剂盒(SteadyPure Virus DNA/RNA Extraction Kit)、质粒抽提试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒、一步法RT-qPCR试剂盒、核酸染料GoldView购自艾科瑞生物工程有限公司;PCR产物纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;WarmStart[®] LAMP试剂盒(DNA & RNA)购自基因有限公司;克隆质粒pMD-20T、感受态细胞DH5 α 购自宝生物工程(大连)有限公司。

主要设备包括超微量核酸蛋白分析仪(BioDrop DUO+,英国柏楛有限公司),荧光定量PCR仪(QuantStudio1,美国应用生物系统公司),凝胶成像系统(Biospectrum AC 410,美国UVP公司),电泳仪(DYY-12,北京六一生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 从NCBI下载CMV *cp* 基因序列,利用ClustalX比对后,选取保守序列使用PrimerExplorer V5设计LAMP简并引物,利用Primer Primer 5.0软件设计RT-qPCR引物、TaqMan荧光探针及全长引物,引物序列如表1所示。

1.2.2 RNA提取 根据RNA提取试剂盒(SteadyPure Virus DNA/RNA Extraction Kit)说明书提取RNA,对植物组织样品具体操作步骤如下:取100 mg植物组织置于液氮中研磨,研磨后加入200 μ L PBS溶液,然后转移至1.5 mL离心管中;依次加入250 μ L Buffer VLS、20 μ L Proteinase K和1.0 μ L Carrier RNA,充分混匀,56 $^{\circ}$ C水浴15 min;12 000 r/min离心3 min,吸取上清液至新的离心管中,加入250 μ L无水乙醇,充分吸打混匀;转移溶液至Mini Column中,静置2 min,12 000 r/min离心2 min;RWA、RWB清洗后用50 μ L无菌水洗脱,得到RNA溶液。

对于病毒液的RNA提取,无需进行第1步研磨操作,后续操作相同。

表 1 RT-LAMP 及 RT-qPCR 相关引物序列
Tab. 1 RT-LAMP and RT-qPCR primer sequences

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	备注 Note
RT-qPCR 引物	FF AATCAACYAGTGCTGGTCGTAAC	<i>cp</i> 基因全长引物
	FB CATCGS CGAAAGATCATACA	
	RTF AGTGCGYGGTCGTARCCGTCG	<i>cp</i> 基因 RT-qPCR 引物
	RTB GACCAGYTGCTAACGTCCTRTTAA	
	probe (VIC)TCGCGAAAGTTGCTGCGACAAG(BHAQ-1)	
RT-LAMP 引物	F3 TCWACCGTGTGGGTGACA	
	B3 CGGSGKACTTTCTCATGTCR	
	FIP CCGTCCGCGAACATAGCAGAGTCCGTAAGTTCCTGCCTC	
	BIP CAGTATGCAGCATCCGGAGTCCCGCATCGCCGAAAGATCA	

1.2.3 质粒构建 以表 1 所列 FF/FB 为 CMV *cp* 基因全长扩增引物, 使用一步法 RT-PCR 试剂盒扩增目的片段, 目的片段大小为 501 bp。回收目的片段, 连接至 pMD-20T, 转化进入 DH5 α , 抽提阳性质粒。

RT-PCR 体系组成: 2 μ L 酶, 12.5 μ L 缓冲液, 1 μ L 引物(终浓度 0.4 μ mol/L), 1 μ L 模板 RNA, 补充 H₂O 至终体积为 25 μ L。扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 预变性 30 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

1.2.4 标准曲线的建立 以 RTF/RTB 为 qPCR 引物, probe 为 TaqMan 荧光探针, 10 倍梯度稀释的质粒 DNA 为模板, 每个浓度 3 个重复。qPCR 体系组成: 0.4 μ L DNA 聚合酶, 10 μ L 缓冲液, 0.4 μ L 引物(终浓度为 0.2 μ mol/L), 0.8 μ L 探针(终浓度为 0.4 μ mol/L), 0.4 μ L ROX 染料(终浓度为 0.08 μ mol/L), 1 μ L 质粒 DNA, 补充 H₂O 至终体积为 20 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 52 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。

1.2.5 RT-qPCR 检测 以 RTF/RTB 为 RT-qPCR 引物, probe 为 TaqMan 探针, 使用一步法 RT-qPCR 试剂盒进行反转录荧光定量 PCR。

RT-qPCR 体系组成: 0.4 μ L DNA 聚合酶, 0.4 μ L 反转录酶, 10 μ L 缓冲液, 0.4 μ L 引物(终浓度为 0.2 μ mol/L), 0.8 μ L 探针(终浓度为 0.4 μ mol/L), 0.4 μ L ROX 染料(终浓度为 0.08 μ mol/L), 1 μ L 模板 RNA, 补充 H₂O 至终体积为 20 μ L。扩增条件: 42 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 52 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。

1.2.6 RT-LAMP 检测 以 F3/B3 为外引物, FIP/BIP 为内引物, 使用一步法 RT-LAMP 试剂盒进行

反转录环介导等温扩增反应。

RT-LAMP 反应体系: 12.5 μ L 反应混合物 (Warmstart Lamp Kit, NEB, USA), 2.5 μ L 外引物 (F3/B3) (终浓度为 0.2 μ mol/L), 2.5 μ L 内引物 (FIP/BIP) (终浓度为 1.6 μ mol/L), 1 μ L 模板 RNA, 补充 H₂O 至终体积为 25 μ L。混匀后加入 20 μ L 石蜡油, 60 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 85 $^{\circ}$ C 保持 5 min 终止反应。

1.2.7 田间样品采集 对在市场随机购买的兰花进行样品采集, 使用无菌剪刀剪下兰花叶片, 除去表面灰尘等, 每个样品称取 100 mg, 按 1.2.2 的方法提取 RNA, 并进行后续试验。

2 结果与分析

2.1 检测方法的建立

2.1.1 *cp* 基因质粒的构建及 RT-qPCR 标准曲线的建立 抽提 CMV 阳性材料 RNA, 以 FF/FB 为引物扩增 *cp* 基因全长用于构建质粒, 片段长度为 501 bp; RTF/RTB 扩增的目的片段长度为 127 bp (结果未显示)。利用 PCR 回收试剂盒回收 *cp* 基因全长扩增产物, 与 pMD-20T 连接, 转化至 DH5 α , 菌落 PCR 验证后, 挑取阳性菌落扩大培养, 抽提质粒。测定 OD₂₆₀, 根据吸光值及质粒碱基数计算得到质粒浓度为 1.8×10^9 copies/ μ L。10 倍梯度稀释该质粒母液至 $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^8$ copies/ μ L, 建立标准曲线如图 1 所示, 标准曲线方程为 $y = -3.244x + 44.359$ ($R^2 = 0.999$), 扩增效率 (E) 为 104.24%, 结果显示本研究中的梯度稀释质粒模板与 Ct 值具有良好的线性关系。对组内 Ct 及组间 Ct 进行变异系数分析发现, 组内及组间重复性良好 (表 2)。

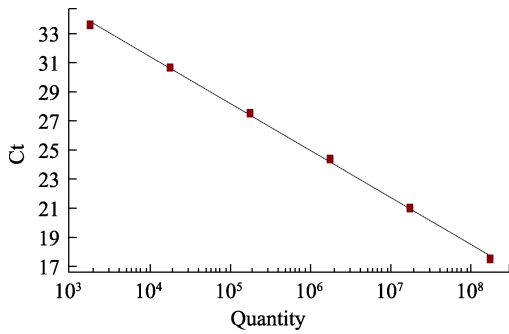


图 1 CMV 质粒 qPCR 标准曲线
Fig. 1 Standard curve of CMV qPCR

2.1.2 RT-LAMP 检测方法的建立 抽提 CMV 阳性材料 RNA，以 F3/B3 为外引物，FIP/BIP 为内

引物建立 RT-LAMP 检测方法。对内外引物比、反应温度、反应时长进行优化（结果未显示），根据 CMV RT-LAMP 反应条件得出结果如图 2 所示，产物经过凝胶电泳后出现明显梯形条带，说明成功建立 RT-LAMP 检测方法。

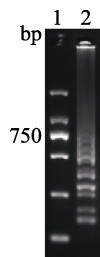
2.2 特异性检测

2.2.1 RT-qPCR 特异性检测 以 CMV、ORSV、CymMV 病毒 RNA 作为模板检测 RT-qPCR 的特异性，结果如图 3 所示，以 CMV RNA 为模板的扩增体系出现典型扩增曲线，ORSV、CymMV 为模板的体系均未出现扩增曲线，扩增结果与预期一致，显示 CMV RT-qPCR 检测方法特异性良好。

表 2 CMV qPCR 重复性分析结果

Tab. 2 Repeatability analysis results of CMV qPCR

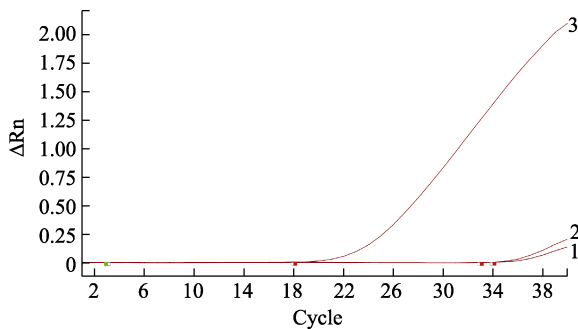
DNA 浓度 DNA concentration/ (copies·μL ⁻¹)	组内重复 Reproducibility of intra-assay			组间重复 Reproducibility of inter-assay		
	平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation/%	平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation/%
1.8×10 ⁸	17.528	0.074	0.421	17.559	0.086	0.492
1.8×10 ⁷	21.011	0.069	0.329	21.061	0.115	0.674
1.8×10 ⁶	24.374	0.084	0.346	24.435	0.140	0.703
1.8×10 ⁵	27.552	0.062	0.224	27.661	0.223	1.106
1.8×10 ⁴	30.683	0.055	0.179	30.812	0.261	1.177
1.8×10 ³	33.661	0.094	0.280	33.951	0.548	2.392



1: DL2000 DNA marker; 2: CMV RNA.

图 2 CMV RT-LAMP 检测结果

Fig. 2 Results of CMV RT-LAMP detection

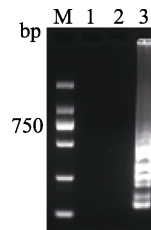


1: ORSV RNA; 2: CymMV RNA; 3: CMV RNA.

图 3 CMV RT-qPCR 方法特异性检测

Fig. 3 Specificity detection of CMV RT-qPCR

2.2.2 RT-LAMP 特异性检测 使用 CMV RT-LAMP 引物对 CMV RNA、CymMV RNA、ORSV RNA 进行 RT-LAMP 扩增，检测该方法的特异性。结果如图 4 所示，凝胶电泳未检测到以 CymMV RNA 及 ORSV RNA 为模板的扩增产物，而以 CMV RNA 为模板的体系产物呈现明显梯形条带，说明 RT-LAMP 检测方法具有针对 CMV 的特异性，结果与预期一致。



M: DL2000 DNA marker; 1: CymMV RNA; 2: ORSV RNA; 3: CMV RNA.

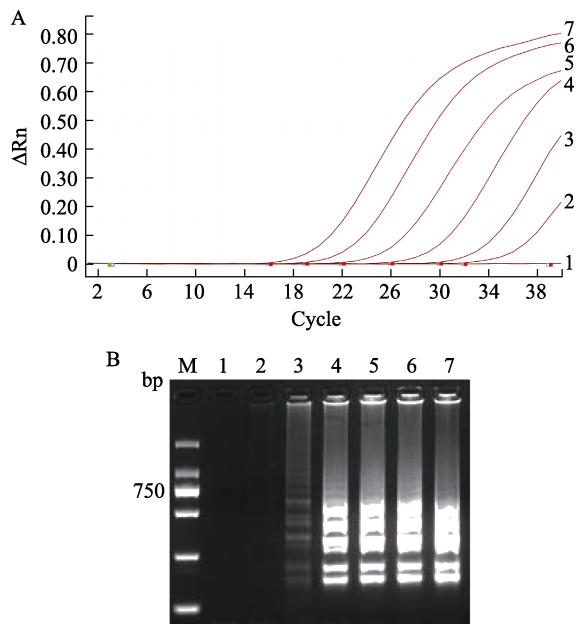
图 4 CMV RT-LAMP 特异性检测结果

Fig. 4 Results of CMV RT-LAMP specificity assays

2.3 灵敏度检测及比较

10 倍梯度稀释 CMV RNA 母液，以 10¹、10²、

10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 稀释液为模板进行 RT-qPCR 和 RT-LAMP 的灵敏性检测。根据图 5A 中的 RT-qPCR 扩增曲线可知, 当 RNA 稀释度在 $10^1 \sim 10^5$ 时出现明显扩增, Ct 值分布在 13.467~33.016 之间, 判读为阳性; 模板为 10^6 稀释液时 Ct 值为 36.094 > 35, 判读为阴性。RT-LAMP 产物的凝胶电泳结果 (图 5B) 显示, 以 $10^1 \sim 10^5$ 稀释液为模板的泳道均出现明显梯形条带, 10^6 稀释液为模板的泳道未出现 DNA 条带。综合图 5 结果可知, RT-qPCR 和 RT-LAMP 对 CMV RNA 检测的灵敏度保持一致。



A: RT-qPCR 检测; B: RT-LAMP 检测; M: DL2000 DNA marker, 1 为 ddH₂O, 2~7 分别为 CMV RNA 的 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 稀释液。

A: RT-qPCR detection; B: RT-LAMP detection; M: DL2000 DNA marker, 1 is ddH₂O, 2~7 is diluted solutions of CMV RNA at 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 and 10^1 , respectively.

图 5 灵敏性检测结果

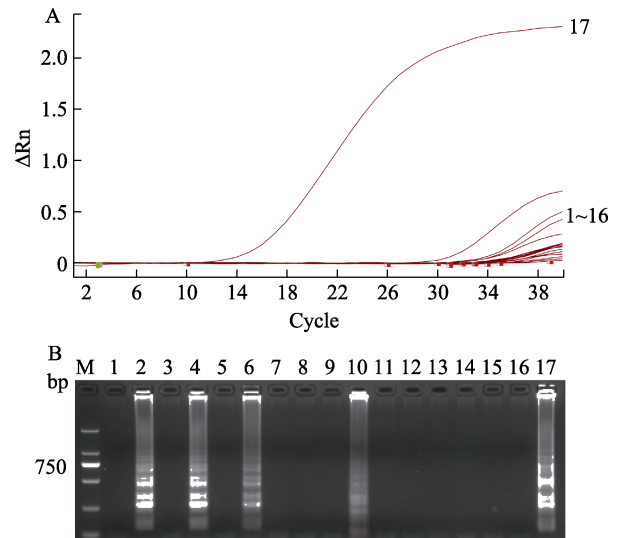
Fig. 5 Sensitivity results

2.4 田间样品检测

为了检验建立的 RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测方法在实际生产中的应用性, 对市场随机购买的 15 株兰花样品进行 CMV 检测。结果如图 6 所示, RT-qPCR (图 6A) 与 RT-LAMP (图 6B) 从 15 个同样的样品中检出 4 个 CMV 阳性, 阳性检出率为 26.7%。

3 讨论

CMV 常规的病毒检测方法主要有免疫学^[31]



A: RT-qPCR 检测; B: RT-LAMP 检测; M: DL2000 DNA marker; 1~15: 样品; 16: ddH₂O; 17: 阳性对照。

A: RT-qPCR detection; B: RT-LAMP detection; M: DL2000 DNA marker, 1~15: Samples; 16: ddH₂O; 17: Positive control.

图 6 田间样品检测结果

Fig. 6 Detection results of field samples

和分子生物学检测^[23-30]。其中, 免疫学检测法需高质量的抗体, 容易出现假阴性, 且成本较高, 不易推广^[32-33]。近年来, 使用分子生物学方法进行检测的报道居多, 分子生物学检测法主要以 PCR 和 LAMP 为基础, 如谭建锡等^[23]利用多重 RT-PCR 方法扩增兰花 5 种病毒目的片段, 将扩增产物与特异性探针杂交, 建立可视化基因芯片检测方法, 该方法可检测出病毒阳性质粒最低浓度为 10^3 copies/ μ L, 但该研究未进行田间样品的检测, 其实际应用性尚未可知; 袁英哲等^[24]建立了甜瓜种子中的黄瓜花叶病毒 RT-LAMP 可视化检测方法, 建立的 LAMP 法灵敏度较常规 RT-PCR 高 10 倍; 涂小云等^[2]建立了针对兰花 CymMV、ORSV 和 CMV 的三重 RT-PCR 检测法, 利用该方法对 17 个蝴蝶兰样品进行检测后发现 13 个样品感染 CymMV、2 个样品感染 ORSV、1 个样品感染 CMV; XUE 等^[25]对大豆的黄瓜花叶病毒、大豆花叶病毒、大豆普通花叶病毒建立了多重 RT-PCR 检测法, 利用该方法检测了 251 份大豆样品, 黄瓜花叶病毒感染率为 15.9%, 大豆花叶病毒阳性率为 35%, 大豆普通花叶病毒阳性率为 17.9%; ZHANG 等^[26]对莴苣的 CMV 病毒建立了 RT-LAMP 检测法, 利用 CMV *cp* 质粒测得该方法的检测极限为 20 fg/mL, 较传统的 RT-PCR 高 100 倍, 对田间样品检出 62.5% 为 CMV 阳性。

以往的 CMV 检测研究或仅建立一种检测方法^[2, 18, 20], 或仅将 RT-LAMP 与 RT-PCR 进行比较^[19, 26]。本研究考虑到 qPCR 为目前主流的分子检测技术, 而 LAMP 作为较新兴的分子检测技术也受到了诸多的关注, 因此建立了针对兰花黄瓜花叶病毒的一步法 RT-qPCR 和一步法 RT-LAMP 检测方法, 并对这 2 种检测方法进行了比较。2 种检测方法包括核酸提取在内的检测时长为 2 h 左右, 且均具有针对 CMV 检测的特异性; 灵敏性检测显示, 2 种方法对 CMV RNA 的检测限保持一致; 对田间 15 株样品进行检测, RT-qPCR 与 RT-LAMP 的阳性检出率为 26.7%, 检出率一致, 互证 2 种方法能够在检疫和实际生产中对植株感染 CMV 的情况进行监测。目前分子生物学检测方法是建立在 DNA 检测的基础上, 在针对 RNA 病毒的检测时, 需要先将 RNA 反转录为 cDNA, 但在这个过程中影响反转录效率的因素较多, 反转录之后的 cDNA 不能真实反映 RNA 丰度。因此本研究采用一步法检测方法, 一方面是为了简化检测过程, 另一方面是为了最大限度减小 RNA 转录为 cDNA 过程中对 RNA 丰度的影响, 以更真实地反映样品中是否有待测病毒。

RT-qPCR 探针法是一种基于 PCR 技术和荧光共振能量转移的方法, 该方法在 DNA 扩增的同时产生荧光信号, 根据荧光信号可对其模板进行定性和定量检测, 具有灵敏性强、准确度高、污染少的特点, 但需要特定仪器。RT-LAMP 从 2000 年建立以来^[34], 因其具有快速、特异和灵敏, 同时还有低成本和对设备低要求的特点而受到广泛的关注, 适合基层和实验室使用, 但该方法存在气溶胶污染的可能性, 易造成样品的假阳性, 且不能定量。2 种方法可根据检测要求和试验条件互补使用, 为生产中的兰花 CMV 病毒监测及植物检疫等提供快速、准确、灵敏的分子生物学监控、检疫手段。

CMV 是危害蔬菜生产和观赏植物栽培的重要病毒之一, 其分子检测方法常被报道, 但针对兰花 CMV 的分子生物学检测方法不常见。本研究建立的 2 种 CMV 分子生物学检测方法针对兰花 CMV 病毒的 *cp* 基因进行扩增, 具有特异性强、灵敏性高, 且具有实际应用性的特点。2 种方法的检测过程耗时仅 1 h 左右, 但病毒 RNA 的抽提过程需耗时 1 h, 后期研究希望能在保证检测效果

的前提下, 简化试验步骤, 省略 RNA 抽提, 以期对兰花 CMV 的检测、防疫提供更快捷、准确、经济的检测手段。

参考文献

- [1] 苏俊明, 张友强. 蝴蝶兰病毒病发生与防治(二)[N]. 中国花卉报, 2008-05-24.
SU J M, ZHANG Y Q. Occurrence and control of *Phalaenopsis* virus disease (2)[N]. China Flower News, 2008-05-24. (in Chinese)
- [2] 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 X Y, DONG X Y, GUO C M, HE J P, BAO E Y. Multiplex RT-PCR detection of three common viruses CymMV, ORSV and CMV infecting *Phalaenopsis amabilis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 91-93. (in Chinese)
- [3] 谢为龙, 谭群英, 李明福, 陈燕芳. 进境兰花的病毒检测[J]. 中国进出境动植物检, 1995(2): 40-41.
XIE W L, TAN Q Y, LI M F, CHEN Y F. Detection of the imported orchid viruses[J]. China Entry and Exit Animal and Plant Inspection, 1995(2): 40-41. (in Chinese)
- [4] SCHOLTHOF K B, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JSCQUOT E, HOHN T, HOHN B, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQUIST P, HEMENWAY C, FOSTER G D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 938-54.
- [5] DUARTE L M L, RIVAS E B, HAKAKAVA R, VEAUUVY M C D, ALEXANDRE M A V. Genealogy of Cucumber mosaic virus isolated from ornamental species[J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4(5): 1081-1087.
- [6] 程晓东, 施伟, 杜志游, 廖乾生. 基于黄瓜花叶病毒(CMV)基因沉默载体的构建[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(12): 1550-1558.
CHENG X D, SHI W, DU Z Y, LIAO Q S. Construction of virus-induced gene silencing vector based on Cucumber mosaic virus (CMV)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(12): 1550-1558. (in Chinese)
- [7] 郭广君, 王述彬, 刘金兵, 潘宝贵, 刁卫平, 戈伟, 高长洲. 植物抗黄瓜花叶病毒基因研究进展[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1430-1436.
GUO G J, WANG S B, LIU J B, PAN B G, DIAO W P, GE W, GAO C Z. Advances in related resistance genes of plant to Cucumber mosaic virus[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(6): 1430-1436. (in Chinese)
- [8] GARCÍA-ARENAL F, PALUKAITIS P. Cucumber mosaic

- virus. Encyclopedia of virology[M]. Oxford: Academic Press, 2008: 614-619.
- [9] PAGAN I, FRAILE A, FERNANDEZ-FUEYO E, MONTES N, ALONSO-BLANCO C, GARCIA-ARENAL F. *Arabidopsis thaliana* as a model for the study of plant-irus covolution[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 2010, 365(1558): 1983-1995.
- [10] 李宁, 尹延旭, 王飞, 姚明华, 赵荣秋, 李雪娟. 辣椒抗 CMV 种质资源筛选及 SRAP 分析[J]. 北方园艺, 2018(3): 1-6.
LI N, YIN Y X, WANG F, YAO M H, ZHAO R Q, LI X Q. Screening and SRAP analysis of germplasm resources for resistance to CMV on pepper[J]. Northern Horticulture, 2018(3): 1-6. (in Chinese)
- [11] 郭广君, 朱雪梅, 潘宝贵, 刁卫平, 刘金兵, 高长洲, 王述彬. 利用 InDel 分子标记辅助选育辣椒抗黄瓜花叶病毒病种质[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(5): 1251-1261.
GUO G J, ZHU X M, PAN B G, DIAO W P, LIU J B, GAO C Z, WANG S B. Innovation of pepper germplasm resource with resistance to Cucumber mosaic virus by InDel molecular marker assisted selection[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2021, 37(5): 1251-1261. (in Chinese)
- [12] 张根莲, 郭广君, 潘宝贵, 刁卫平, 刘金兵, 戈伟, 王述彬. 辣椒抗黄瓜花叶病毒病候选基因功能鉴定[J]. 分子植物育种, 2020, 18(17): 5537-5543.
ZHANG G L, GUO G J, PAN B G, DIAO W P, LIU J B, GE W, WANG S B. Functional identification of candidate genes of resistance to Cucumber mosaic virus in pepper[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(17): 5537-5543. (in Chinese)
- [13] 程立锐, 陈小翠, 代帅帅, 马冰, 任民, 蒋彩虹, 刘旦, 文柳瓔, 杨爱国. 烟草黄瓜花叶病毒抗性位点发掘[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(4): 1-6.
CHENG L R, CHEN X C, DAI S S, MA B, REN M, JIANG C H, LIU D, WEN L Y, YANG A G. Identification of QTL associated with resistance to Cucumber mosaic virus in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(4): 1-6. (in Chinese)
- [14] 李姣, 任秋蓉, 古蕾, 朱晓换, 王亚男. 微量植物组织直接 RT-PCR 反应检测 4 种植物病毒的方法建立与优化[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2021, 44(1): 111-117.
LI J, REN Q R, GU L, ZHU X H, WANG Y N. Establishment and optimization of plant microtissue direct reverse transcription-polymerase chain reaction (MD RT-PCR) for detection of four types of plant viruses[J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2021, 44(1): 111-117. (in Chinese)
- [15] 祖庆学, 李宏江, 聂忠扬, 于晓飞, 张翼飞, 李昊熙. 一套适合烤烟 3 种 RNA 病毒的 RT-PCR 检测方法[J]. 广西植保, 2021, 34(2): 27-31.
ZU Q X, LI H J, NIE Z Y, YU X F, ZHANG Y F, LI H X. RT-PCR detection method for three RNA viruses from flue-cured tobacco[J]. Guangxi Plant Protection, 2021, 34(2): 27-31. (in Chinese)
- [16] 盛佳婧, 钟琳, 杨朝柱, 张绍彬, 谢吉容, 吴金平, 胡中立, 刁英. 一种分子检测魔芋中黄瓜花叶病毒的方法[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(9): 2252-2255.
SHENG J J, ZHONG L, YANG C Z, ZHANG S B, XIE J R, WU J P, HU Z L, DIAO Y. Method for detecting Cucumber mosaic virus in konjac on molecular level[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(9): 2252-2255. (in Chinese)
- [17] 施农农, 徐莺, 王慧中, 谢礼, 洪健. 复合感染建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的兰花超微结构观察及病原物快速鉴定[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 153-163.
SHI N N, XU Y, WANG H Z, XIE L, HONG J. Molecular identification of Cymbidium mosaic potexvirus and Odonoglossum ringspot tobamovirus complex infected *Phalaenopsis* and its pathological ultrastructural alteration[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, 40(2): 153-163. (in Chinese)
- [18] 潘俊松, 刘志听, 郑学勤. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. 热带作物学报, 1997, 18(1): 63-70.
PAN J S, LIU Z X, ZHENG X Q. Identification and serological detection of Cymbidium mosaic virus infecting orchids in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1997, 18(1): 63-70. (in Chinese)
- [19] 袁守鑫, 谭冠林, 李凡, 王钰丽, 马琼仙, 孔丽. 云南部分兰花病毒病的病害调查及病原鉴定[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(3): 325-328.
YI S X, TAN G L, LI F, WANG Y L, MA Q X, KONG L. Survey and pathogens identification of viral disease on partial orchids in Yunnan[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2008, 23(3): 325-328. (in Chinese)
- [20] 谢林娜, 苏梦芸, 朱明明, 贡宏涛, 朱丽梅, 徐敏, 张波, 甘黎明, 罗凤霞. 不同品种蝴蝶兰 2 种病毒的 ELISA 检测及其症状表现[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 80-83.
XIE L N, SU M Y, ZHU M M, GONG H T, ZHU L M, XU M, ZHANG B, GAN L M, LUO F X. ELISA detection and symptoms of two viruses in different varieties of *Phalaenopsis*[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2017, 45(3): 80-83. (in Chinese)
- [21] 任锐, 魏永路, 朱根发, 杨凤玺. 广东省国兰病毒病害调查及 CymMV 和 ORSV 基于 *cp* 基因的系统进化分析[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 372-383.
REN R, WEI Y L, ZHU G F, YANG F X. Investigation of

- Chinese Cymbidium viral disease, and phylogenetic analysis of *cp* gene of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ring spot virus in Guangdong province[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(2): 372-383. (in Chinese)
- [22] 于子翔, 李丽, 俞禄珍, 杨翠云, 吴建祥, 黄卫昌, 于翠. 建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒联合免疫胶体金试纸条的研制及应用[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 139-143.
YU Z X, LI L, YU L Z, YANG C Y, WU J X, HUANG W C, YU C. Complex gold immunochromatography assay and application for rapid detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus[J]. Plant Protection, 2017, 43(6): 139-143. (in Chinese)
- [23] 谭建锡, 周慧平, 莫瑾, 朱金国, 吴志鹏, 彭梓. 兰花 5 种病毒可视化基因芯片检测方法建立[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5): 654-660.
TAN J X, ZHOU H P, MO J, ZHU J G, WU Z P, PENG Z. Visual DNA microarrays for detection of five orchid virus[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(5): 654-660. (in Chinese)
- [24] 袁英哲, 罗明, 韩剑, 潘亚南. 甜瓜种子中黄瓜花叶病毒和小西葫芦黄花叶病毒的 RT-LAMP 可视化检测方法[J]. 中国农学通报, 2020, 36(20): 107-113.
YUAN Y Z, LUO M, HAN J, PAN Y N. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of Cucumber mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus in melon seeds[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(20): 107-113. (in Chinese)
- [25] XUE B, SHANG J, YANG J, ZHANG L, DU J B, YU L, YANG W Y, NAEEM M. Development of a multiplex RT-PCR assay for the detection of Soybean mosaic virus, Bean common mosaic virus and Cucumber mosaic virus in field samples of soybean[J]. Journal of Virological Methods, 2021, 298: 114278.
- [26] ZHANG Y B, XIE Z K, FLETCHER J D, WANG Y J, WANG R Y, GUO Z H, HE Y H. Rapid and sensitive detection of Lettuce necrotic yellows virus and Cucumber mosaic virus infecting lettuce (*Lactuca sativa* L.) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. The Plant Pathology Journal, 2020, 36(1): 76-86.
- [27] SRIVASTAVA N, KAPOOR R, KUMAR R, KUMAR S, R K S, KUMAR S, BARANWAL V K. Rapid diagnosis of Cucumber mosaic virus in banana plants using a fluorescence-based real-time isothermal reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay[J]. Journal of Virological Methods, 2019, 270: 52-58.
- [28] SU M K, SUN H C. Simultaneous detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in orchids using multiplex RT-PCR[J]. Virus Genes, 2015, 51: 417-422.
- [29] ALI R N, DANN A L, CROSS P A, WILSON C R. Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids[J]. Archives of Virology, 2014, 159(11): 3095-3099.
- [30] KIM M K, JEONG R D, KWAK H R, LEE S H, KIM J S, KIM K H, CHA B, CHOI H S. First report of Cucumber mosaic virus isolated from wild *Vigna angularis* var. *nipponeensis* in Korea[J]. The Plant Pathology Journal, 2014, 30(2): 200-207.
- [31] 邓海滨, 阮小蕾. 广东烟区黄瓜花叶病毒胶体金检测试纸条的研制及应用[J]. 现代农业科技, 2020(8): 99-101.
DENG H B, RUAN X L. Preparation and application of Cucumber mosaic virus colloid gold test strip in Guangdong tobacco area[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(8): 99-101. (in Chinese)
- [32] 陈进. 百合病毒检测技术研究进展[J]. 潍坊工程职业学院学报, 2016, 29(3): 102-105.
CHEN J. Research progress of lily virus detection technology[J]. Journal of Weifang Engineering Vocational College, 2016, 29(3): 102-105. (in Chinese)
- [33] 杨丹, 赵斌安, 许燕, 张琪, 吴文静, 浦心祎, 袁文天, 赵悦琪, 赵恒震, 史斌. 百合病毒检测技术研究进展[J]. 生物学通报, 2021, 56(7): 1-3.
YANG D, ZHAO B A, XU Y, ZHANG Q, WU W J, PU X W, YUAN W T, ZHAO Y Q, ZHAO H Z, SHI B. Research progresses on the technology of lily virus detection[J]. Bulletin of Biology, 2021, 56(7): 1-3. (in Chinese)
- [34] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28: e63.