网络出版时间:2025-10-31 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.04.016

茶梅花叶病病毒种类鉴定及多重PCR检测技术建立

朱宏佩[1,2],黄温柔[1],刘欢[1],刘斐[3]

(1 安康学院 现代农业与生物科技学院,陕西 安康 725000;2 安徽农业大学 园艺学院,安徽 合肥 230036;
3 咸阳市农业科学研究院,陕西 咸阳 712000)

[摘 要] 【目的】明确引起茶梅(*Camellia sasanqua*)花叶病的病毒种类和主要病毒的全基因组序列,建立可靠的病毒分子检测技术,为茶梅病毒病的早期诊断和抗病毒育种提供参考。【方法】以2022年7月至2024年3月,采自陕西、浙江、福建和江苏地区具有黄化、褪绿、植株矮小等症状的茶梅叶片为材料,通过小RNA(sRNA)测序技术鉴定茶梅花叶病的病毒种类,并克隆病毒的全基因组序列,研究其分子变异情况。建立茶梅3种病毒一步法多重RT-PCR(mRT-PCR)快速诊断技术并进行优化。【结果】在表现花叶症状的茶梅叶片中检测到山茶环斑相关病毒3(camellia ringspot-associated virus 3,CRSaV-3)、山茶黄化环斑病毒(camellia yellow ringspot virus,CaYRSV)和山茶乙型线形相关病毒3(camellia japonica associated metaflexid virus 3,CjBV-3)3种病毒。系统发育结果显示,茶梅3种病毒分子变异较小,但与来源于山茶花(*C. japonica*)的分离物相比,仍然存在较大的分子变异。建立了3种茶梅病毒一步法mRT-PCR检测技术,该检测技术具有快速、高效、操作简便等优点。【结论】首次鉴定了茶梅花叶病的病毒种类,克隆获得3种茶梅病毒的11条全基因组序列,建立了茶梅病毒mRT-PCR检测技术,该技术具有快速、高效、操作简便等特点,可用于CRSaV-3、CaYRSV和CjBV-3的快速检测。

[关键词] 茶梅花叶病;病毒鉴定;多重RT-PCR(mRT-PCR)
[中图分类号] S432.1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)04-0143-09

Identification of virus species of *Camellia sasanqua* mosaic disease and establishment of multiplex PCR detection technology

ZHU Hongpei[1,2],HUANG Wenrou[1],LIU Huan[1],LIU Fei[3]

(1 *College of Modern Agriculture and Biotechnology,Ankang University,Ankang,Shaanxi* 725000,*China*;
2 *School of Horticulture,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui* 230036,*China*;
3 *Xianyang Agricultural Research Academy,Xianyang,Shaanxi* 712000,*China*)

Abstract:【Objective】This research aims to determine the species of viruses that cause *Camellia sasanqua* mosaic disease and the complete genome sequences of the main viruses,and develop reliable molecular detection protocols to facilitate early disease diagnosis and support antiviral breeding.【Method】*C. sasanqua* leaves were collected from symptomatic plants exhibiting yellowing,chlorosis,and dwarf in Shaanxi,Zhejiang,Fujian,and Jiangsu from July 2022 to March 2024. Small RNA (sRNA) sequencing was used to identify the virus species,and the

[收稿日期] 2025-01-10 [修回日期] 2025-04-25
[基金项目] 国家自然科学基金项目(32000123);陕西省重点研发计划项目(2024NC-YBXM-058);陕西省高校青年创新团队项目(2023AYTD01);陕西省教育厅协同创新中心项目(23JY003);国家级大学生创新训练项目(202211397007,202411397014)
[作者简介] 朱宏佩(2002—),女,陕西彬州人,在读硕士,主要从事园艺植物病害防治研究。E-mail:2220489525@qq.com
[通信作者] 刘欢(1990—),男,陕西周至人,副教授,博士,主要从事植物病毒学研究。E-mail:liuh2020@126.com

中国知网 https://www.cnki.net

complete genome sequence was obtained to study its molecular variation. A one-step multiplex RT-PCR (mRT-PCR) rapid diagnosis technology for three viruses of *C. sasanqua* mosaic disease was established and optimized. 【Result】 Three viruses, including camellia ringspot-associated virus 3 (CRSaV-3), camellia yellow ringspot virus (CaYRSV) and camellia japonica associated metaflexid virus 3 (CjBV-3), were identified in *C. sasanqua* with mosaic symptoms. The phylogenetic analysis revealed that these three viruses in *C. sasanqua* exhibited relatively low levels of molecular variation, but significant difference still can be observed compared to the isolates derived from *C. japonica*. In addition, a one-step mRT-PCR detection technique for these three viruses of *C. sasanqua* mosaic disease was established with advantages of rapidity, high efficiency and simple operation. 【Conclusion】 This work firstly identified the viruses associated with *C. sasanqua* mosaic disease, and 11 complete genome sequences of them were cloned successfully. A mRT-PCR detection technology for these virus was established, which was fast, efficient, and easy to operate for detection of CRSaV-3, CaYRSV, and CjBV-3.

Key words: *Camellia sasanqua* mosaic disease; virus identification; multiplex RT-PCR (mRT-PCR)

茶梅(*Camellia sasanqua* Thunb.)是山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)的一种园艺观赏植物[1]。据史书记载,茶梅原产于中国,因其树形优美、花叶繁盛、着花量多且花期长而备受人们喜爱,既可孤植于庭院和草坪中,也可与其他花灌木配置花坛、花境,具有很高的经济效益和社会效益。然而,随着茶梅栽培面积扩大,一些茶梅病害相继被报道,叶片病害的发生降低了茶梅的观赏性,给生产带来严重的经济损失[2-4]。茶梅花叶病是一类由植物病毒引起的病害,受病毒侵染的茶梅叶片主要表现为花叶、黄化、褪绿等症状,严重影响茶梅的观赏价值。

二代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS)以其高通量、不依赖已知核酸序列、高灵敏度等优点,在新病毒发现、已知病原识别、基因组遗传多样性与演化分析等方面得到了广泛的应用[5-6]。陈方淇等[7]利用小RNA测序技术在紫花苜蓿中检测到5种病毒;李梦[8]利用小RNA测序技术明确了侵染兰州百合的病毒种类;荆陈沉等[9]利用小RNA测序技术结合RT-PCR,明确了侵染山西番茄的病毒种类及其复合侵染类型。

目前,引起茶梅花叶病的病毒种类尚未见报道,严重阻碍了该病的快速检测、生物学、基因组学和流行病学相关研究。为了广泛推广栽培茶梅,减轻或避免病毒病的发生为害,本研究通过小RNA测序技术鉴定茶梅花叶病的病毒种类,明确主要病毒的全基因组序列,并建立灵敏度高、特异性强的检测技术,为茶梅花叶病的预测预报和综合防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 茶梅叶片收集

2022年7月至2024年3月,在陕西、浙江、福建和江苏收集叶片黄化、褪绿、植株矮小等疑似病毒侵染的茶梅植株叶片,置于-80 ℃保存备用。

1.2 主要试剂

2×*Taq* MasterMix、OmniPlant RNA Kit(DNase I)、Gel Extraction Micro Kit,均购自北京康为世纪;pBM16A Toposmart Cloning Kit,购自北京博迈德;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、Phusion™ Plus DNA Polymerase,购自Thermo Fisher Scientific;HiScript Ⅱ One Step RT-PCR Kit(Dye Plus),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;SMARTer RACE 5′ 3′ Kit(TaKaRa),购自宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为实验室常规试剂。

1.3 小RNA(sRNA)测序

将采集的具有花叶、褪绿、植株矮小等症状的茶梅叶片,送至北京百迈客生物科技有限公司进行高通量测序。

1.4 病毒特异性检测和全基因组扩增引物设计

根据小RNA测序结果,通过Blast比对找到sRNA在病毒基因组中的位置,设计病毒特异性检测引物,用于验证sRNA测序数据及病毒基因组扩增。引物信息详见表1,引物由西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成。

1.5 茶梅总RNA提取及cDNA合成

取100 mg茶梅叶片,在液氮中迅速研磨成粉状,使用OmniPlant RNA Kit(DNase I)提取茶梅总RNA;取3 μL RNA,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit合成第一链cDNA。

1.6 PCR检测及克隆测序

PCR反应体系:cDNA 1 μL,正、反向引物各1 μL,2×*Taq* MasterMix 12.5 μL,ddH_2O 9.5 μL。反

中国知网 https://www.cnki.net

应程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，退火温度（详见表 1）下退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，循环 30 次；72 ℃终延伸 5 min。目的条带经 Gel Extraction Micro Kit 回收后连接至 pBM16A 载体上，并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，每个基因挑取 3 个阳性克隆，送西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序。

表 1　茶梅花叶病病毒特异性检测及病毒基因组扩增的引物信息

Table 1　Information of primers for specific detection of *Camellia sasanqua* mosaic disease virus and amplification of viral genome

引物名称 Primer name	引物序列（3′→5′） Primer sequences（3′→5′）	退火温度/℃ Annealing temperature	目的条带大小/bp Target strip size	用途 Objective
CRSaV-3-F	CCAACATCTACAGTGATGTTGG	54	553	CRSaV-3 检测 Detection of CRSaV-3
CRSaV-3-R	GCTGCTTGAAGTTCCTGAAACTTAT			
CaYRSV-F	AGAAATCACAGATGGGCTCCTTG	53	725	CaYRSV 检测 Detection of CaYRSV
CaYRSV-R	CGGGTATGACCTTCCTGATTTC			
CjBV-3-F	CACGACGAAGTTTCGGAATGG	54	536	CjBV-3 检测 Detection of CjBV-3
CjBV-3-R	ACCTTAGCCCTCATTGGAAAACC			
CRSaV-3-608F	AAAGTCAGGCGTAGATCTAATATTCATACATG	59	3 321	CRSaV-3 基因组扩增 Genome amplification of CRSaV-3
CRSaV-3-3859R	GTGTCATTGAATTGCTCTGACCAGA			
CRSaV-3-3058F	CATCTCTAAACAGAGCTAGATCCTTTAG	60	3 794	
CRSaV-3-6852R	CTCTACCAAGAACTCTAGTGCGTG			
CaYRSV-RNA1-538F	GATGTCGACTCAGGAGTATCTCG	59	3 172	CaYRSV 基因组 RNA1 扩增 Genome amplification of CaYRSV RNA1
CaYRSV-RNA1-3710R	AGTGGTTCAGTTGAAACAGGGAAATTG			
CaYRSV-RNA1-3525F	CTTAAGACTGCTGAGAATGAGGTACAAG	61	1 793	
CaYRSV-RNA1-5318R	GTTGCCTTAGGCAACCTTCCTATAATAATAG			
CaYRSV-RNA2-184F	CGAAACGTGGATTGTGAGGATACG	60	1 896	CaYRSV 基因组 RNA2 扩增 Genome amplification of CaYRSV RNA2
CaYRSV-RNA2-2080R	CTCAAGAAGACCTGTTGACGATCAG			
CjBV-3-56F	GCAATGGCTTCAGTGATGATAAGAACTC	59	3 396	CjBV-3 基因组扩增 Genome amplification of CjBV-3
CjBV-3-3452R	ACTTTCCAATACTCCTCCTATCTTTGC			
CjBV-3-3193F	CTTCTGGAGTGATTGGATTCACTCAG	60	3 344	
CjBV-3-6537R	CACTTCTTTCAGATCTCACATCAATGC			
CRSaV-3-5Rw	ATAAACAAGGAGTGAGCTCCATGATTCTC	62	964	CRSaV-3 5′RACE
CRSaV-3-5Rn	GATCCACATACCTTTACTCTTGGAC	57	866	
CRSaV-3-3F	GATCCACATCTTACAAAATCTCTCAAG	58	1 556	CRSaV-3 3′RACE
CaYRSV-RNA1-5Rw	GGCTCATCTCTAGGAAAAGAGTG	58	797	CaYRSV RNA1 5′RACE
CaYRSV-RNA1-5Rn	GGAAATGTTCGCGTAAAAGCTTCATC	60	685	
CaYRSV-RNA1-3F	GACACACATTGAACGCTATAG	54	1 095	CaYRSV RNA1 3′RACE
CaYRSV-RNA2-5Rw	CAGTAAGTTGACCTTGATCCATCTC	58	586	CaYRSV RNA2 5′RACE
CaYRSV-RNA2-5Rn	CCAGGATTTCCATTCACTTCATCTTC	58	449	
CaYRSV-RNA2-3F	GAAGACTCGCATGGACGAGATCTTC	62	536	CaYRSV RNA2 3′RACE
CjBV-3-5Rw	GAGGTTCTAATATGCCAGCTAATAATTCTG	61	713	CjBV-3 5′RACE
CjBV-3-5Rn	CCAGTGATGAACCTCATCGTGTATG	60	610	
CjBV-3-3F	TGGTTGATCTCTCGAGAGGCTCCGAG	58	1 426	CjBV-3 3′RACE

1.7　病毒全基因组扩增与分析

选择来自陕西、浙江、江苏和福建的茶梅花叶样本，待 RT-PCR 确认阳性后，病毒基因组采用长链 PCR 进行扩增，病毒末端序列采用 SMARTer RACE 5′ 3′ Kit 进行扩增。PCR 反应体系（50 μL）：5× Phusion™ Plus Buffer 10 μL，正、反向引物各 2.5 μL，dNTPs 1 μL，cDNA 2 μL，Phusion™ Plus DNA Polymerase 0.5 μL，ddH_2O 31.5 μL。PCR 反应程序：98 ℃预变性 30 s；98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 2 min，循环 30 次；72 ℃终延伸 5 min。长链 PCR 产物直接测序，RACE 产物回收连接 pBM16A 载体，经转化后测序。使用 ContigExpress 软件，将测序得到的序列进行拼接，获得病毒全基因组序列。使用 MEGA 7.0，采用 Neighbor-Joining（NJ）法构建病毒系统发育树，各分支置信度（Bootstrap）进行 10 000 次重复分析。

中国知网　https://www.cnki.net

1.8 茶梅病毒mRT-PCR检测技术的建立与优化

根据病毒全基因组比对结果,在其保守区域设计3种茶梅病毒及内参基因的特异性检测引物,引物信息详见表2。先用单一RT-PCR检测引物的特异性,然后利用HiScript One Step RT-PCR Kit初步建立以RNA为模板的mRT-PCR多重检测技术。基础反应体系:茶梅总RNA 2.5 μL,2×One Step Mix 25 μL,One Step Enzyme Mix 2.5 μL,正、反向引物各2 μL,RNase-free H_2O 16 μL。反应程序:50 ℃反转录30 min;94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,35个循环;72 ℃终延伸7 min。取3 μL PCR产物进行凝胶电泳检测。

表2 茶梅病毒mRT-PCR同步检测引物信息

Table 2 Information of primers for simultaneous detection of *Camellia sasanqua* mosaic disease virus by mRT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列(3′→5′) Primer sequences(3′→5′)	退火温度/℃ Annealing temperature	目的条带大小/bp Target strip size
CRSaV-3-mF	GTCAGTTCAACTCAAGACTGATG	59	561
CRSaV-3-mR	TCTACCAAGAACTCTAGTGCGTG		
CaYRSV-mF	GTGTCCGAAAGACATAACCGTTA	58	432
CaYRSV-mR	CTTGTACCTCATTCTCAGCAGTC		
CjBV-3-mF	GCTGAGATTGAGAAGGCAATTGTC	59	329
CjBV-3-mR	CCTATGCTGCTCGTCCATTATTG		
CM-EF-1α-F	AGATTGACAGGAGGTCTGGTAAG	57	120
CM-EF-1α-R	AGTGGTGGGTACTCTGAGAAAG		

在初步建立的mRT-PCR检测方法基础上,分别对反应体系中的引物浓度和反应程序中的退火温度、延伸时间、循环次数进行优化。其中引物浓度设0.1,0.2,0.3,0.4和0.5 μmol/L 5个处理,退火温度设50,52,54,56,58和60 ℃ 6个处理,延伸时间设30,45,60,75和90 s 5个处理,循环次数设25,30,35,40和45共5个处理,最终确定多重PCR反应的最佳反应体系和反应程序。

1.9 多重PCR检测技术的灵敏度测定

以同时携带CRSaV-3、CjBV-3和CaYRSV 3种病毒的茶梅总RNA为模板,对模板进行10倍梯度稀释,比较单重PCR和多重PCR检测的灵敏度。

1.10 多重PCR检测技术的应用

从陕西省安康市陕南花木大世界收集茶梅样本44份,编号依次为1~44,其中2,6,9,29,36叶片褪绿;3,4,5,11,13,15,17,19,21,22,23,28,32,34,37,38,39,42,44叶片边缘黄花;1,12,14,18,20,25,35,40,43叶片褪绿且边缘黄化;16和27植株矮小,新叶轻微坏死斑;7,8,10,24,26,41,30,31,33无明显症状。利用建立好的一步法mRT-PCR体系对其茶梅病毒进行检测,以评价该方法的稳定性和准确性。

2 结果与分析

2.1 茶梅花叶病sRNA测序结果分析

茶梅花叶病叶片样品经sRNA测序获得22 661 329条raw reads,去除不合格reads,得到19 580 971条clean reads。利用Velnet软件将测序获得的sRNA拼接组装成病毒的重叠群,共获得4 540 contigs,contigs长度主要集中在30~60 nt,之后与NCBI RNA病毒数据库进行比对,结果显示采集的茶梅花叶病叶片样本中可能存在CRSaV-3、CjBV-3和CaYRSV 3种病毒。RT-PCR均能扩增到与预期大小一致的单一条带,经克隆测序后证实,茶梅花叶病样本中存在CRSaV-3、CjBV-3和CaYRSV病毒。

2.2 3种茶梅病毒全基因组扩增与系统发育分析

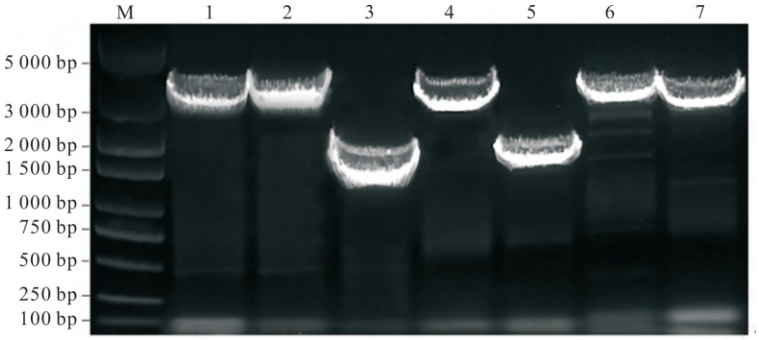
根据sRNA测序结果,分析sRNA在病毒基因组的位置,设计特异性扩增引物,使用RT-PCR对病毒基因组进行长片段扩增,获得与预期大小一致的片段(图1)。

在基因组末端设计RACE引物,分别以3′RACE-ready cDNA和5′RACE-ready cDNA为模板,使用特异性引物和UPM通用引物进行扩增,得到的扩增条带与预期引物设计的大小相符合。经测序拼接后共获得完整病毒基因组序列11条,上传GenBank并获得Access number:PQ741448-PQ741462。

CRSaV-3属于乙型线形病毒科(Betaflexiviridae)发状病毒属(*Capillovirus*)成员,基因组属于+ssRNA,本研究共获得5个分离物,分别来自陕西、江苏、福建、浙江,其全基因组大小为7 375~7 451 nt,与已报道的来自美国的CRSaV-3山茶分

中国知网 https://www.cnki.net

离物核苷酸一致性为92%～93%。以同属成员苹果茎沟病毒（apple stem grooving virus，ASGV）为外部根，系统发育树结果（图2）显示，CRSaV-3山茶分离物和茶梅分离物之间存在较大的分子变异，且不同地理来源CRSaV-3均为单独分支。这表明CRSaV-3的群体遗传结构与地理位置有一定相关性，还需要更多的基因组序列共同分析才能证实。



M. DNA Marker DL 5000；1. 使用CjBV-3-56F/3452R扩增CjBV-3基因组前半段，扩增条带约3.4 kb；2. 使用CjBV-3-3193F/6537R扩增CjBV-3基因组后半段，扩增条带约3.3 kb；3. 使用CaYRSV-RNA1-3525F/5318R扩增CaYRSV RNA1基因组后半段，扩增条带约1.8 kb；4. 使用CaYRSV-RNA1-538F/3710R扩增CaYRSV RNA1基因组前半段，扩增条带约3.2 kb；5. 使用CaYRSV-RNA2-184F/2080R扩增CaYRSV RNA2基因组，扩增条带约1.9 kb；6. 使用CRSaV-3-3058F/6852R扩增CRSaV-3基因组后半段，扩增子条带约3.8 kb；7. 使用CRSaV-3-608F/3859R扩增CRSaV-3基因组前半段，扩增子条带约3.3 kb。

M. DNA Marker DL 5000；1. The first half of the CjBV-3 genome was amplified using CjBV-3-56F/3452R，and the amplified size was approximately 3.4 kb；2. The second half of the CjBV-3 genome was amplified using CjBV-3-3193F/6537R，and the amplified size was approximately 3.3 kb；3. The second half of the CaYRSV RNA1 genome was amplified using CaYRSV-RNA1-3525F/5318R，and the amplified size was approximately 1.8 kb；4. The first half of the CaYRSV RNA1 genome was amplified using CaYRSV-RNA1-538F/3710R，and the amplified size was approximately 3.2 kb；5. The CaYRSV RNA2 genome was amplified using CaYRSV-RNA2-184F/2080R，and the amplified size was approximately 1.9 kb；6. The second half of the CRSaV-3 genome was amplified using CRSaV-3-3058F/6852R，and the amplicon size was approximately 3.8 kb；7. The first half of the CRSaV-3 genome was amplified using CRSaV-3-608F/3859R，and the amplicon size was approximately 3.3 kb.

图1　3种茶梅病毒的全基因组扩增结果

Fig. 1　Complete genome amplification results of three *Camellia sasanqua* mosaic disease viruses

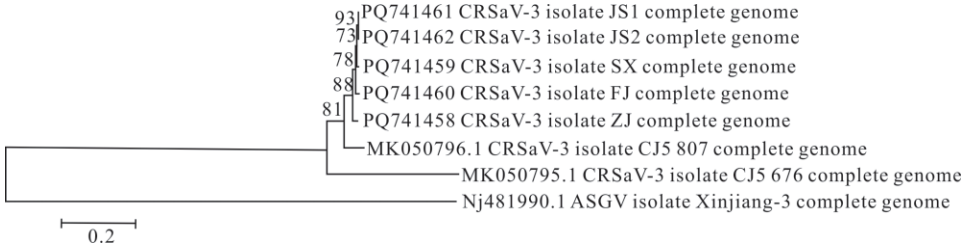


图2　基于CRSaV-3全基因组核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on the complete genome nucleotide sequence of CRSaV-3

CjBV-3属于乙型线形病毒科（Betaflexiviridae）李病毒属（*Prunevirus*）成员，是山茶环斑相关病毒2（camellia ringspot-associated virus 2，CRSaV-2）的一个突变体，本研究获得了CjBV-3陕西和浙江茶梅分离物序列信息，其基因组全长分别为7 794和7 795 nt，不包含Poly（A），与已报道的意大利和美国山茶分离物核苷酸一致性为84%～96%。以同属成员猕猴桃种传潜隐病毒（actinidia seed borne latent virus，ASbLV）为外部根，系统发育树结果（图3）显示，CjBV-3茶梅分离物与意大利山茶分离物之间的亲缘关系较近，而与美国山茶分离物之间存在较大的分子变异。

CaYRSV属于悬钩子病毒属（*Idaeovirus*），该属暂没有科的分类阶元。本研究共获得了陕西、江苏和浙江共4个分离物序列信息。CaYRSV基因组为三分子线形＋ssRNA，其中RNA1长5 321～5 331 nt；RNA2长2 215～2 253 nt；RNA 3是亚基因组片段，编码病毒外壳蛋白，基因大小为813 nt。以该属模式种悬钩子丛矮病毒（raspberry bushy dwarf virus，RBDV）为外部根构建进化树，结果（图4）显示CaYRSV的RNA1和RNA2基因组似乎存在一定的地理位置相关性，不同地理位置来源的病毒分离物均处于单独分支，且RNA1

中国知网　https://www.cnki.net

和RNA2进化似乎是独立的,来源于陕西的CaYRSV RNA1与重庆的山茶分离物关系最近,而来源于浙江的CaYRSV RNA2与重庆的山茶分离物关系最近。

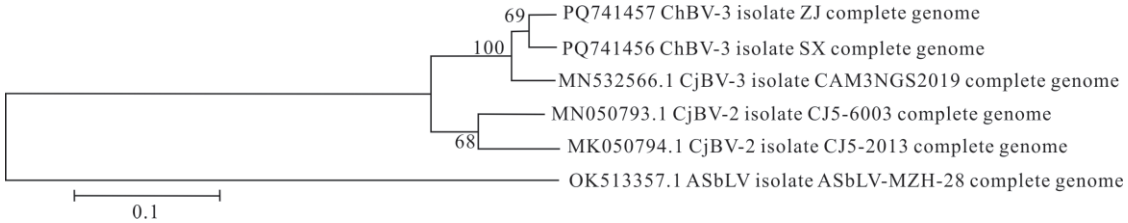


图3 基于CjBV-3全基因组核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the complete genome nucleotide sequence of CjBV-3

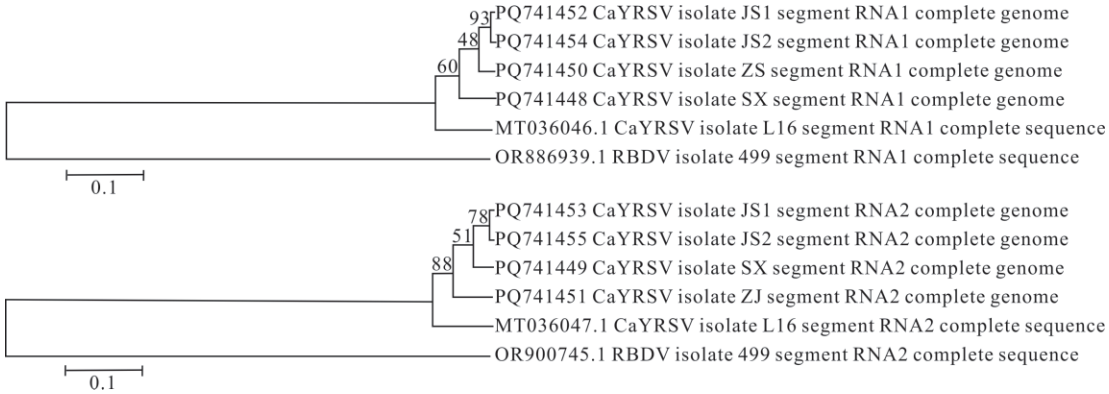
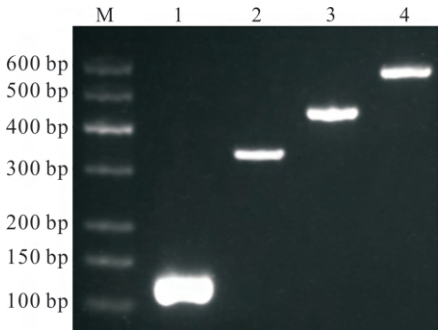


图4 基于CaYRSV全基因组核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the complete genome nucleotide sequence of CaYRSV

2.3 茶梅病毒病一步法mRT-PCR快速检测技术的建立与优化

本研究针对茶梅3种病毒设计多重检测引物,首先利用单一PCR检测引物的特异性,经验证,3种病毒和茶梅内参基因EF-1α的扩增条带单一,无其他杂带,可用于多重检测(图5)。



M. DNA Marker;1~4. 依次为RT-PCR检测茶梅内参EF-1α、CjBV-3、CaYRSV和CRSaV-3。

M. DNA Marker;1-4. RT-PCR detection of EF-1α, CjBV-3, CaYRSV and CRSaV-3 in turn.

图5 茶梅内参基因EF-1α和3种病毒扩增引物的特异性检测

Fig. 5 Specificity detection of primers for amplification of the internal reference gene EF-1α and 3 viruses of *C. sasanqua* mosaic disease

以mRT-PCR基础反应参数为初始条件,通过单一条件优化,确定多重PCR的最佳反应体系和反应程序。结果(图6)表明,当反应体系引物浓度为0.2 μmol/L时,3种病毒的扩增片段及内参基因条带亮度最高且均一;当退火温度为54 ℃时,3种病毒目的片段及内参基因条带最清晰;延伸时间对体系影响较小,在30~90 s均能扩增出清晰的条带,当延伸时间高于45 s时,条带亮度无变化,因此确定最优延伸时间为45 s;循环次数为35次时,所有条带最清晰。最终确定mRT-PCR反应条件及参数为:茶梅总RNA 2.5 μL,各引物浓度0.2 μmol/L,50 ℃反转录30 min;94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,54 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,35个循环;72 ℃终延伸7 min。

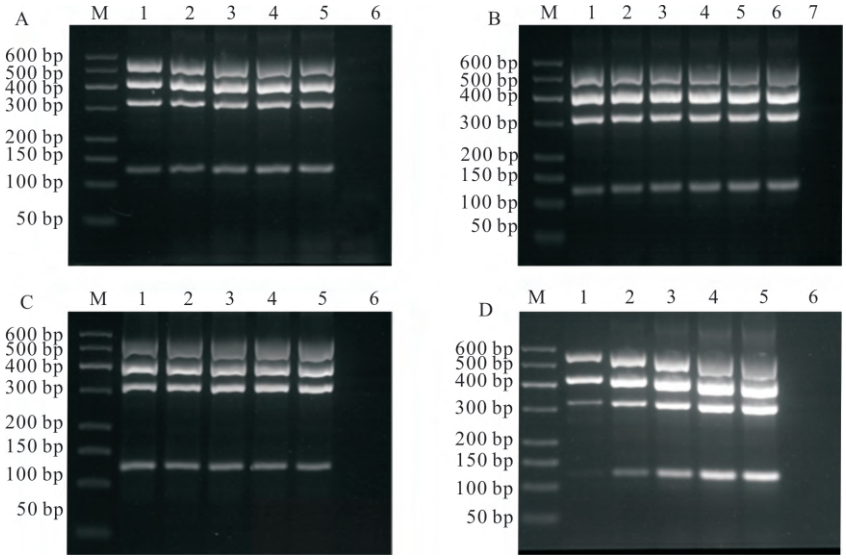
2.4 RT-PCR和mRT-PCR灵敏度比较

对同时携带CRSaV-3、CjBV-3和CaYRSV 3种病毒的茶梅总RNA进行10倍梯度稀释,采用单一引物和多重引物进行灵敏度检测,结果(图7)显示,mRT-PCR检测灵敏度与RT-PCR相当。

2.5 茶梅样品的mRT-PCR检测

从陕南花木大世界收集到44份茶梅叶片样品,多重PCR检测结果(图8)表明,茶梅病毒病田间复合侵染普遍,但在无症状的叶片中未检测到病毒。

中国知网 https://www.cnki.net

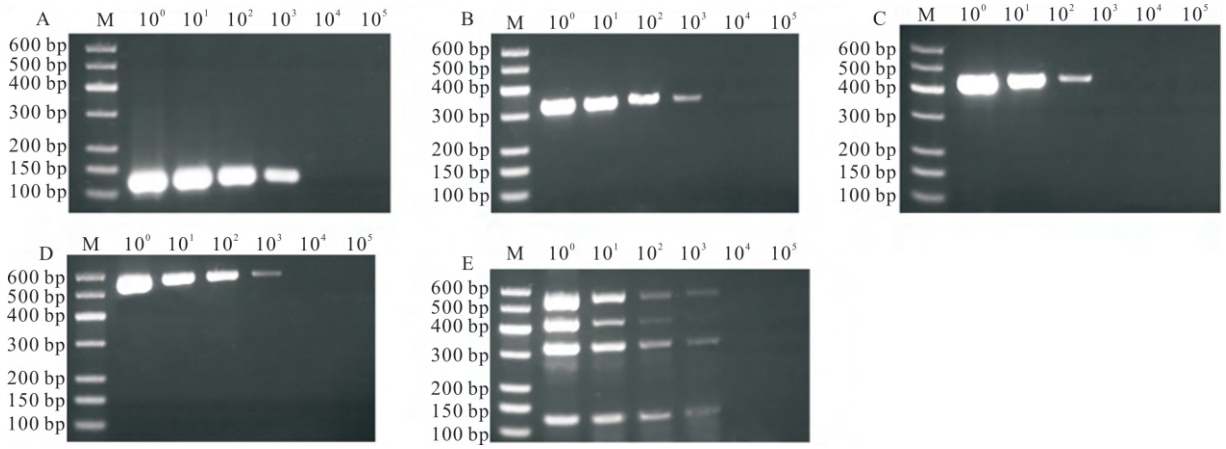


A. 引物浓度优化，M. DNA Marker；1～5依次为0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 μmol/L；6. 阴性对照。B. 退火温度优化，M. DNA Marker；1～6依次为50，52，54，56，58，60 ℃；7. 阴性对照。C. 延伸时间优化，M. DNA Marker；1～5依次为30，45，60，75，90 s；6. 阴性对照。D. 循环次数优化，M. DNA Marker；1～5依次为25，30，35，40，45次；6. 阴性对照。

A. Optimization of primer concentration，M. DNA Marker；1－5 represent 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 μmol/L in sequence；6. Negative control. B. Optimization of annealing temperature，M. DNA Marker；1－6 represent 50，52，54，56，58，60 ℃ in sequence；7. Negative control. C. Optimization of extension time，M. DNA Marker；1－5 represent 30，45，60，75，90 s in sequence；6. Negative control. D. Optimization of cycle number，M. DNA Marker；1－5 represent 25，30，35，40，45 times in sequence；6. Negative control.

图6　mRT-PCR反应条件和参数优化

Fig. 6　Reaction conditions and parameter optimization for mRT-PCR



A～D. 依次为EF-1α、CjBV-3、CaYRSV和CRSaV-3单重RT-PCR灵敏度检测；E. mRT-PCR灵敏度检测。

A－D. Sensitivity detection of EF-1α，CjBV-3，CaYRSV and CRSaV-3 by single-plex RT-PCR；E. mRT-PCR sensitivity detection.

图7　RT-PCR和mRT-PCR灵敏度对比

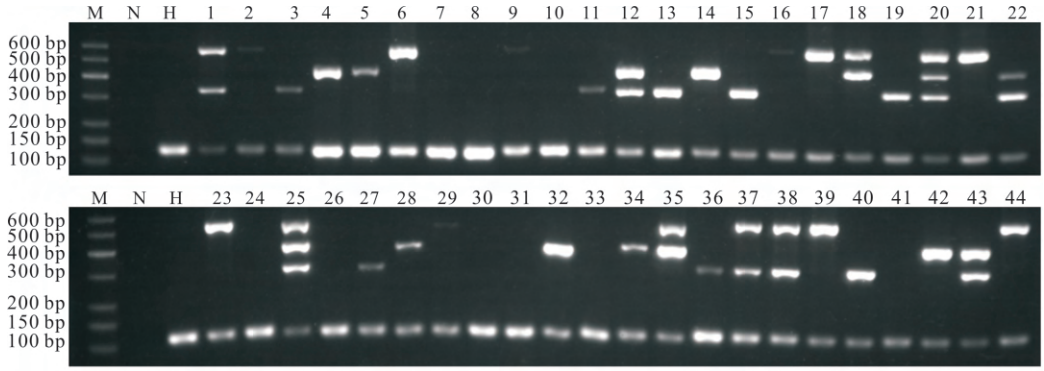
Fig. 7　Comparison of sensitivity between RT-PCR and mRT-PCR

3　讨　论

中国是许多山茶属植物的原产地，规模化种植为病害的发生流行创造了有利条件。植物病毒病是一类重要病害[10]，几乎在所有园艺作物上都有发生，对世界农业和园艺生产造成持续性为害。茶梅是当今山茶属中四大观赏树种之一，有着“阳光茶花”的美誉，广泛应用于园林绿化工程中[11]。山茶科植物病毒病相关研究有限[12-14]，目前仅在茶树[15]、油茶[16]和山茶[17]上有病毒病的报道，共涉及16种病毒，分布于9科12属。截至目前，尚未见侵染茶梅的病毒种类报道，但茶梅花叶病在田间发生普遍。由于不清楚病毒种类以及病毒为害特征、传播方式等基础信息，加之茶梅生产中多采用扦插繁殖，种质资源的国际交流日益频繁，病毒传播速度快、面积广，无法开展有针对性的防治工作。为了解决这

中国知网　https://www.cnki.net

一问题,本研究运用小RNA深度测序技术对茶梅病毒病进行种类鉴定,并对3种茶梅病毒的全基因组进行克隆分析,建立了一步法mRT-PCR快速高效检测技术,为茶梅病害的分子检测、病害测报、抗病毒育种等研究提供科学依据。



M. DNA Marker;N. 阴性对照;H. 健康对照;1~44. 来自陕南花木大世界的茶梅叶片样本。

M. DNA Marker;N. Negative control;H. Healthy control;1—44. *Camellia sasanqua* leaf samples from flower and seedling world in southern Shaanxi.

图8 44份茶梅样品的mRT-PCR检测结果

Fig. 8 Results of mRT-PCR detection of 44 *Camellia sasanqua* samples

小RNA测序技术在植物病毒的鉴定中发挥着重要作用[18-19]。当病毒侵染植物后,可诱导产生双链小分子RNA(dsRNA);dsRNA在Dicer酶的作用下,加工得到小干扰RNA(small interfere RNA,siRNA);siRNA渗入RNA诱导沉默复合物去识别目标病毒序列,并与之结合,降解病毒片段。因此,对小RNA进行高通量测序,获得与病毒序列高度一致的siRNA序列,再通过重新组装获得病毒基因组信息,为植物病毒鉴定提供证据。

多重PCR检测技术可同时扩增多个目的基因,具有高效、方便、省时省工等优势,广泛应用于植物病毒病害检测[20-23]。周涛等[24]基于二代测序技术,发现5种病毒侵染雪茄烟,并成功建立了雪茄烟病害多重RT-PCR检测方法;丁超[25]依据病毒编码的外壳蛋白编码序列,设计针对辣椒病毒的3对PCR检测引物,建立了可同时检测TMV、PMMoV和CMV的多重RT-PCR技术。传统的mRT-PCR设计多采用反转录和PCR分开进行,且多以cDNA为模板进行优化,虽然cDNA模板不易降解,但试验步骤较多,耗时较长,反转录和PCR分开操作也容易带来污染问题。本研究优化了检测步骤,直接以茶梅总RNA为模板,开发了一步法mRT-PCR检测技术,节约了时间,简化了试验步骤,同时降低了污染风险。另外,由于RNase广泛存在于环境中,茶梅总RNA在提取过程中可能因为操作不当或环境问题导致RNA降解,从而影响病毒检测的准确性。对此,快速检测体系引入了茶梅内参基因*EF*-1α,最大限度避免了检测中出现的假阴性问题。

4 结 论

本研究首次鉴定了茶梅花叶病的病毒种类,克隆了CRSaV-3、CaYRSV和CjBV-3病毒的全基因组序列,并建立了这3种茶梅病毒一步法mRT-PCR检测技术,为茶梅病毒病预测预报和有效防治提供参考。

[参考文献]

[1] 韩国勇. 不同茶梅品种杂交亲和性分析[J]. 热带作物学报,2018,39(12):2377-2382.
HAN G Y. Analysis on the cross compatibility among different *Camellia sasanqua* cultivars[J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2018,39(12):2377-2382.

[2] 刘晓明. 滇山茶花叶病毒鉴定及其花叶呈色机理研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2016.
LIU X M. Camellia reticulata mosaic virus identification and mosaic color mechanism research[D]. Kunming:Kunming University of Science and Technology,2016.

[3] 段维军,段丽君,刘芳,等. 进境茶梅中山茶叶杯菌的检疫鉴定[J]. 中国森林病虫,2020,39(6):1-9.
DUAN W J,DUAN L J,LIU F,et al. Quarantine identification of *Ciborinia camelliae* from the *Camellia sasanqua* imported from Japan[J]. Forest Pest and Disease,2020,39(6):1-9.

[4] YANG C X. First report of *Haradamyces foliicola* causing leaf blight on *Camellia sasanqua* in China[J]. Journal of Plant Pathology,2025,107(1):767.

[5] SURREY L F,OAKLEY F D,MERKER J D,et al. Next-generation sequencing (NGS) methods show superior or equivalent

中国知网 https://www.cnki.net

performance to non-NGS methods on BRAF, EGFR, and KRAS proficiency testing samples[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2019, 143(8): 980-984.

[6] 刘青，周书玉，崔冬丽，等. 高通量测序技术在植物病毒分类中的应用[J]. 西南大学学报(自然科学版)，2022，44(7)：87-95.
LIU Q, ZHOU S Y, CUI D L, et al. High-throughput sequencing technology and its application in plant virus detection[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2022, 44(7): 87-95.

[7] 陈方淇，王乐，吴杰，等. 基于小RNA深度测序技术对呼和浩特地区紫花苜蓿病毒病病原检测及分析[J]. 中国草地学报，2024，46(9)：76-86.
CHEN F Q, WANG L, WU J, et al. Identification and characterization of alfalfa virus pathogens in Inner Mongolia using small RNA deep sequencing[J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(9): 76-86.

[8] 李梦. 基于小RNA深度测序的兰州百合主要病毒病原鉴定、复合侵染致病作用及防治[D]. 兰州：甘肃农业大学，2024.
LI M. Based on small RNA deep sequencing identification of main virus pathogens of Lanzhou lily and co-infection pathogenic effect and control[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2024.

[9] 荆陈沉，罗露，霍思凡，等. 山西省番茄病毒种类鉴定及侵染类型分析[J/OL]. 植物病理学报，1-13(2024-12-26)[2025-01-09]. https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001356.
JING C C, LUO L, HUO S F, et al. Identification and analysis of tomato viruses and infection types in Shanxi Province[J]. Journal of Plant Pathology, 1-13(2024-12-26)[2025-01-09]. https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001356.

[10] HAO X Y, ZHANG W F, ZHAO F M, et al. Discovery of plant viruses from tea plant (*Camellia sinensis*) by metagenomic sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2175.

[11] MANZINI J, HOSHIKA Y, SICARD P, et al. Detection of morphological and eco-physiological traits of ornamental woody species to assess their potential Net O_3 uptake[J]. Environmental Research, 2024, 252: 118844.

[12] ZHANG S, YANG L, MA L S, et al. Virome of *Camellia japonica*: discovery of and molecular characterization of new viruses of different taxa in camellias[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 945.

[13] PERACCHIO C, FORGIA M, CHIAPELLO M, et al. A complex virome including two distinct emara viruses associated with virus-like symptoms in *Camellia japonica*[J]. Virus Research, 2020, 286: 197964.

[14] LIAO R L, CHEN Q Y, ZHANG S, et al. Complete genome sequence of *Camellia* virus A, a tentative new member of the genus Waikavirus[J]. Archives of Virology, 2021, 166(11): 3207-3210.

[15] XIE X Y, ZHU C X, HAN X Y. First report on the occurrence of grapevine leafroll-associated virus 7 in tea plants[J]. Journal of Plant Pathology, 2022, 104(1): 455.

[16] WU X Y, LIU J H, CHENG X F. First report of *Camellia japonica* associated emaravirus 1 associated with *Camellia* leaf ringspot and flower color-breaking disease in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(12): 3271.

[17] 单文书，牛婷婷，陈伟立，等. 山茶属植物病毒病害的研究进展[J]. 中国植保导刊，2024，44(5)：22-29.
SHAN W S, NIU T T, CHEN W L, et al. Research pro-gress on virus diseases of *Camellia* plants[J]. China Plant Protection, 2024, 44(5): 22-29.

[18] SHAHID M S, SHAFIQ M, ILYAS M, et al. Frequent occurrence of mung bean yellow mosaic India virus in tomato leaf curl disease affected tomato in *Oman*[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16634.

[19] XU Y X, LI S F, NA C Y, et al. Analyses of virus/viroid communities in nectarine trees by next-generation sequencing and insight into viral synergisms implication in host disease symptoms[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12261.

[20] PALLÁS V, SÁNCHEZ-NAVARRO J A, JAMES D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2087.

[21] ONOZUKA N, OHKI T, OKA N, et al. One-step real-time multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay with melt curve analysis for detection of potato leafroll virus, potato virus S, potato virus X, and potato virus Y[J]. Virology Journal, 2021, 18(1): 131.

[22] ZHAO Z X, XIANG J, TIAN Q, et al. Development of one-step multiplex RT-PCR assay for rapid simultaneous detection of five RNA viruses and *Acidovorax citrulli* in major cucurbitaceous crops in China[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(12): 696.

[23] LIU H, WU K, WU W, et al. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants[J]. Journal of Virological Methods, 2019, 265: 53-58.

[24] 周涛，周士栋，兰鑫宇，等. 基于二代测序技术及多重RT-PCR的四川雪茄烟病毒鉴定[C]//中国植物病理学会. 植物病理科技创新与绿色防控：中国植物病理学会2021年学术年会论文集. 北京：中国农业科学技术出版社：2021：294-295.
ZHOU T, ZHOU S D, LAN X Y, et al. Identification of Sichuan cigar smoke virus based on second-generation sequencing technology and multiple RT-PCR[C]//Chinese Society for Plant Pathology. Plant pathology science and technology innovation and green prevention and control: proceedings of the 2021 academic annual conference of the Chinese Plant Pathology Society. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2021: 294-295.

[25] 丁超. 辣椒烟草花叶病毒的分子鉴定及检测技术研究[D]. 贵阳：贵州师范大学，2017.
DING C. Molecular identification and detection methods of tobacco mosaic virus isolated from pepper[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2017.

（责任编辑：陈丽）

中国知网　https://www.cnki.net