

3 种甘薯病毒多重 PCR 检测方法的建立与应用

李文宗¹, 梁鑫¹, 杨露露¹, 王润豪¹, 王磊^{2*}

(1. 河南华智营养科技有限公司, 河南新乡 453000; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 针对甘薯卷叶病毒(SPLCV)、甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV)的外壳蛋白(CP)基因序列, 设计了3种病毒的3对特异性引物, 扩增大小分别为180、295、774 bp, 通过对引物添加量、退火温度、循环数等反应条件的优化, 完善了能同时扩增出SPLCV、SPFMV、SPCSV 3种病毒的多重PCR体系, 可以实现同时对甘薯3种病毒10⁴拷贝水平的检测, 并具有良好的特异性。利用该技术体系, 对不同田间样品进行了检测, PCR产物测序表明, 3种病毒序列与已知的参考序列同源率一致性分别达到94%、94%、97%及以上。建立能够同时进行3种病毒检测的多重PCR检测技术体系, 可以快速准确地进行甘薯脱毒苗病毒检测和田间样品的诊断。

关键词 甘薯; 甘薯卷叶病毒(SPLCV); 甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV); 甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV); 多重PCR

中图分类号 S435.313 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)22-0089-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.22.022

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Establishment and Application of Multiplex PCR for Detection of Three Viruses in Sweet Potato

LI Wen-zong, LIANG Xin, YANG Lu-lu et al (Henan Huazhi Nutrition Technology Co., Ltd., Xinxing, Henan 453000)

Abstract Three pairs of specific primers for sweet potato leaf curl virus (SPLCV), sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) and sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) were designed based on conserved region sequences of the coat protein (CP) genes published in NCBI. The amplification size was 180, 295 and 774 bp respectively. By optimizing the reaction conditions such as primer addition amount, annealing temperature and number of cycles, the multiplex PCR system that could simultaneously amplify three viruses, namely, SPLCV, SPFMV and SPCSV were improved. It could simultaneously detect 10⁴ copy levels of three sweet potato viruses, and had good specificity. Using this method to detect field samples, the compound infected virus could be detected accurately. Sequence analysis showed that the sequence homology of the target fragments were 98%, 94% and 97% respectively. The results showed that the establishment of a multiplex PCR detection technology system capable of simultaneously detecting three viruses could rapidly and accurately conduct virus detection of sweet potato virus-free seedlings and diagnosis of field samples.

Key words Sweet potato; Sweet potato leaf curl virus (SPLCV); Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV); Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV); Multiplex PCR

甘薯病毒病是甘薯的重要病害, 具有种类繁多、分布广泛、容易传播、危害严重、防控困难等特点。甘薯是无性繁殖作物, 在感染病毒后, 在甘薯体内病毒会不断积累, 逐代加重, 进而引起甘薯产量和品质的下降以及种性的退化, 严重损害甘薯产业的健康发展^[1], 是目前限制甘薯生产的主要因素之一。已知侵染甘薯的病毒有30余种^[2-3]。甘薯卷叶病毒(sweet potato leaf curl virus, SPLCV)、甘薯羽状斑驳病毒(sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)、甘薯褪绿矮化病毒(sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)是3种严重危害甘薯的病毒, 在世界甘薯种植区广泛分布^[4-6]。其中, SPLCV为单链环状DNA病毒, 基因组大小约2.8 kb, 是双生病毒科菜豆金色花叶病毒属成员^[7]; SPFMV为正义单链RNA病毒, 基因组大小约10 kb, 是马铃薯Y病毒科马铃薯Y病毒属成员; SPCSV为双组份正义单链RNA病毒, 基因组大小约15.3~16.0 kb, 是长线形病毒科毛行病毒属成员^[8]。不同品种甘薯植株在遭受SPLCV病毒侵染后, 会表现出不同程度的致病症状, 如叶片向上卷曲、黄化等, 此外其叶绿素含量指数、叶面积、叶片鲜重均有所降低^[9]。SPFMV和SPCSV可以协生共侵染甘薯引起甘薯病毒病害(sweet potato virus disease, SPVD)^[10], 甘薯植株在单独受到SPFMV或SPCSV后的症状表现轻微, 而受SPVD感染的甘薯植株表现出明显的矮

化、叶片褪绿、花叶明脉等症状^[11]。SPVD的发生能够显著影响甘薯的产量, 在SPVD发生严重时, 可使甘薯的产量损失达到90%以上, 甚至绝收, 其原因在于甘薯植株在感染SPVD病毒后, 其叶片叶绿素含量降低导致光合速率下降, 进而影响甘薯的产量^[12-14]。有研究表明, SPFMV在我国不同甘薯产区普遍存在, 而种薯是否携带SPCSV则是苗期甘薯病毒病发生的关键因素^[4, 15-16]。因此, 推广和应用甘薯脱毒种苗, 可以有效地防止病毒病造成的危害。

病毒检测是脱毒苗生产和田间苗病毒鉴定的重要环节之一, 甘薯病毒病常用的检测方法有症状学诊断法、指示植物检测法(生物学检测法)、血清学检测法、分子生物学检测法等。以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为代表的分子生物学检测技术正逐步成为病毒检测的主要方法。PCR技术的应用弥补了症状学诊断法、指示植物检测法、血清学检测法的不足, 如准确性低, 检测周期长, 假阳性反应率高等。常规PCR技术检测一次只能检测一种病毒, 对于复合侵染的病毒需要进行多次PCR反应, 操作较为烦琐。而多重PCR是在普通的单一PCR基础上发展起来的, 可以同时扩增多个基因, 具有灵敏、快速、高效、成本低、特异性强、步骤简便等特点, 适合进行大量甘薯样品的检测^[17]。目前关于应用多重PCR对2种及以上的甘薯病毒的检测已有相关研究^[18-21], 但对于SPLCV、SPFMV和SPCSV 3种病毒的多重RT-PCR检测鲜见相关报道。建立针对以上3种常见甘薯病毒的多重PCR检测技术具有广阔的应用前景。笔

作者简介 李文宗(1991—), 男, 河南叶县人, 博士, 从事作物代谢调控与分子设计育种研究。*通信作者, 研究员, 博士, 从事作物代谢调控与分子设计育种研究。

收稿日期 2021-12-17

者以单一 PCR 为基础,全面优化多重 PCR 反应体系,建立了以上 3 种常见甘薯病毒的多重 PCR 检测体系,以期为甘薯病毒检测提供一种简便、快捷的分子生物学方法,为甘薯田间病毒鉴定和甘薯脱毒苗的生产提供有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料 材料:供试甘薯样本为采自河南新乡的带有明显病毒症状的甘薯田间样本;将经过检测不含 SPLCV、SPFMV、SPCSV 3 种病毒的甘薯脱毒组培苗作为阴性对照。

试剂:植物 DNA 提取试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒购自百奥曼公司,反转录试剂盒、2×Taq Mix Pro(+Dye) 购自

莫纳生物公司,SPLCV 病毒重组质粒(含 SPLCV CP 基因)、SPFMV 病毒重组质粒(含 SPFMV CP 基因)、SPCSV 病毒重组质粒(含 SPCSV CP 基因)由河南华智营养科技有限公司构建保存,其他所应用的试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成。根据 NCBI 数据库中收录的 SPLCV、SPFMV 和 SPCSV^[21] 外壳蛋白(CP)基因的核苷酸保守序列和文献分别设计和合成引物。引物均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 甘薯病毒的特异性引物
Table 1 Specific primers of sweet potato virus

病毒名称 Virus	引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')	PCR 产物大小 Size of PCR product//bp
甘薯卷叶病毒 SPLCV	SPLCV-F	ACTTCGAGACAGCTATCGTG	180
	SPLCV-R	ACGAATTCAAGATGGATGTC	
甘薯羽状斑驳病毒 SPFMV	SPFMV-F	GCTGAAGCTTACATAGAAATG	295
	SPFMV-R	CATAACCTCTTAGGAATGA	
甘薯褪绿矮化病毒 SPCSV	SPCSV-F	ACGAGTATGGCTGATAGCACTAA	774
	SPCSV-R	GTGAAGACCTGTTCCAGTCAACT	

1.2.2 核酸的提取。称取约 100 mg 的甘薯叶片,经液氮研磨后按照植物总 RNA 提取试剂盒和植物总 DNA 提取试剂盒说明书分别提取甘薯叶片 RNA 和 DNA。利用琼脂糖凝胶电泳分别检测 RNA 和 DNA 的提取质量。

1.2.3 单一 PCR 反应体系和条件。采用 MonScript™ RTⅢ Super Mix with dsDNase (Two-step)的说明书进行反转录试验,获取待测样品的第 1 链 cDNA,并以获取的高质量 DNA 或 cDNA 作为模板,分别对 3 种病毒进行特异性扩增检测。单一 PCR 反应体系:2×Taq Mix Pro(+Dye) 10.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,DNA 模板或 cDNA 模板各 1.0 μL,无菌水补足至 20 μL。具体反应程序:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,循环数为 35;72 ℃最终延伸 10 min。

待 PCR 扩增反应结束后,取 5 μL 扩增反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结束后,采用凝胶成像仪进行结果分析和记录。

1.2.4 多重 PCR 检测反应条件的优化和建立。以 SPLCV、SPFMV、SPCSV 3 种病毒基因组混合质粒作为模板,参考单一 PCR 反应体系,加入以上 3 种病毒的特异性引物进行多重 PCR 反应,对能够影响多重 PCR 的几个主要条件(引物添加量、退火温度、循环数)依次进行优化,在进行某一个条件的优化时,应保持其他反应条件不变。

引物 SPLCV-F/R:SPFMV-F/R:SPCSV-F/R 的使用量比例设置 5 个处理:0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.2 μL/0.2 μL;0.1 μL/0.1 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.4 μL/0.4 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL。

循环数分别设 25、30、35、40 次;退火温度分别设 48、52、56、58、62 ℃。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 多重 PCR 的特异性检测。分别以构建完成的 SPLCV、SPFMV、SPCSV 3 种病毒基因组质粒作为模板,应用微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度,根据阿伏伽德罗常数将浓度换算为拷贝数。以浓度分别为 10⁷ 拷贝/μL 的 SPLCV、SPFMV、SPCSV 病毒基因组重组质粒当作模板,进行多重 PCR,检测反应体系的特异性。同时,利用经检测不含有甘薯病毒的组培苗样品测试多重 PCR 体系的特异性。

1.2.6 多重 PCR 的灵敏性检测。将 SPLCV、SPFMV、SPCSV 3 种病毒的基因组重组质粒混合,随后进行 10 倍稀释,选取浓度为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 拷贝/μL 5 个浓度梯度的 3 种病毒混合质粒作为检测模板,进行多重 PCR 检测,以进行多重 PCR 的灵敏性检测。

1.2.7 多重 PCR 的初步应用。从新乡市郊区采集带有相应病毒症状的甘薯田间样本,利用建立的多重 PCR 体系进行检测。

1.2.8 PCR 产物的测序与序列分析。切胶回收部分多重 PCR 扩增产物,并将回收后的 PCR 产物送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行测序,测序完成后,利用 BLAST 工具、DNAMAN 软件将测序结果进行序列比对和同源率分析。

2 结果与分析

2.1 病毒总 RNA 和 DNA 提取及质量检测 分别利用植物总 RNA 提取试剂盒和 RNA 提取试剂盒获取质量较高的核酸。RNA 凝胶电泳显示(图 1a),28S rRNA、18S rRNA 条带清晰,28S 和 18S 的亮度比为 1.5:1.0~2.0:1.0,无 DNA 条带,无拖尾及弥散条带,表明蛋白质和酚类物质基本去除,且完整性良好,可以进行后续试验。DNA 凝胶电泳结果显示(图

1b),基因组条带单一明亮,无弥散条带,说明 DNA 没有发生降解,纯度较高,可以进行后续试验。

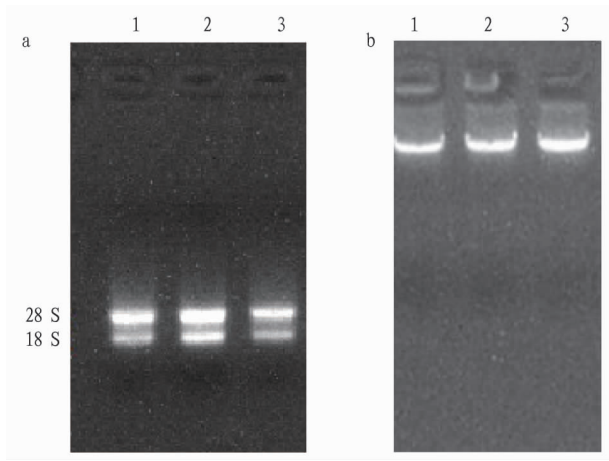
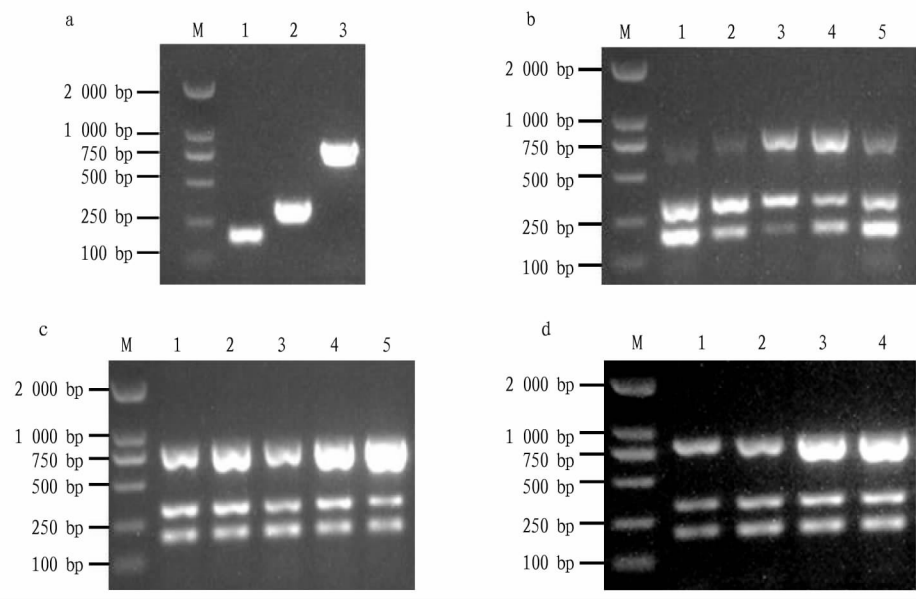


图 1 甘薯叶片总 RNA (a)、总 DNA (b) 琼脂糖凝胶电泳检测结果
Fig.1 Electrophoresis of total RNA (a), DNA (b) extracted from leaves of sweet potato

2.2 多重 RT-PCR 反应体系的优化和确立 以带有病毒甘薯样品的 DNA/cDNA 作为模板,分别利用 SPLCV、SPFMV 和 SPCSV 3 种病毒的特异性引物进行单一 PCR 扩增,分别扩增出 180、295、774 bp 的特异性条带,符合预期目的条带大小(图 2a)。在对 SPLCV、SPFMV 和 SPCSV 3 种病毒的多重 RT-PCR 反应体系的优化方案中,以单一 RT-PCR 作为基础,分别对引物添加量、退火温度、循环次数进行优化。3 对特异性引物不同添加量优化试验结果显示,3 对引物不同添加量组合对扩增产物的影响较大,对 774 和 180 bp 的目的条带扩增影响尤为明显,综合比较在不同添加量情况下 3 条目的条带的扩增亮度,多重 PCR 检测体系的选择引物配比组合为:0.2 μL/0.2 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL,且 3 种病毒扩增的目的条带均比较明亮(图 2b)。退火温度优化试验显示,退火温度为 48、52、56、58、62 ℃ 时,均可扩增出目的条带,在 58 ℃ 时,各目的条带扩增有效性接近,因此选择 58 ℃ 作为多重 PCR 的最佳退火温度(图 2c)。当循环数为 25、30、35、40 次时,均能扩增出目的条带,且随循环数增加,



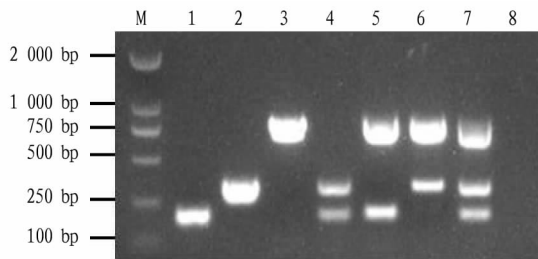
注:M.DL Marker 2000;a.单一 PCR 检测结果(泳道 1~3:SPLCV、SPFMV、SPCSV);b.引物浓度优化结果(泳道 1~5:SPLCV-F/R:SPFMV-F/R:SPCSV-F/R 的添加量分别为 0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.2 μL/0.2 μL;0.1 μL/0.1 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.4 μL/0.4 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;c.退火温度优化结果(泳道 1~5:48、52、56、58、62 ℃);d.循环数优化结果(泳道 1~4:25、30、35、40 次)
Note:M.DL Marker 2000;a.Simple PCR (Lane 1-3:SPLCV,SPFMV,SPCSV);b.The optimization of primers (Lanes 1-5: The addition amount of primers SPLCV-F/R:SPFMV-F/R:SPCSV-F/R wer 0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL:0.2 μL/0.2 μL;0.1 μL/0.1 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.2 μL/0.2 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;0.4 μL/0.4 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;c.The optimization of annealing temperature (Lanes 1-5:48,52,56,58,62 ℃);d.The optimization of cycle times (Lanes 1-4: 25,30,35,40 times)

图 2 多重 PCR 检测反应条件的优化
Fig.2 Optimization results of reaction conditions for multiplex PCR

774 bp 的目的条带亮度不断增加,其中当循环次数分别为 35 和 40 次时,两者差异不大,综合考虑,选择 35 次作为最优的循环次数(图 2d)。根据以上不同条件的优化结果,最终确定多重 RT-PCR 最佳反应体系为:2×Taq Mix Pro (+Dye) 10 μL, SPLCV 上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL,SPFMV 上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL,SPCSV 上下游引物(10 μmol/L)各

0.5 μL,DNA/cDNA 模板各 1.0 μL,补足 ddH₂O 至 20 μL。反应程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 最终延伸 10 min。
2.3 多重 PCR 检测体系的特异性 特异性检测试验结果表明,利用建立的多重 PCR 方法均能在单一质粒、两两混合质粒和 3 种混合的质粒中扩增出对应的目的条带,而从不含

有病毒的脱毒组培苗样品中未扩增出目的条带(图3)。这说明建立的多重PCR检测体系具有良好的特异性。



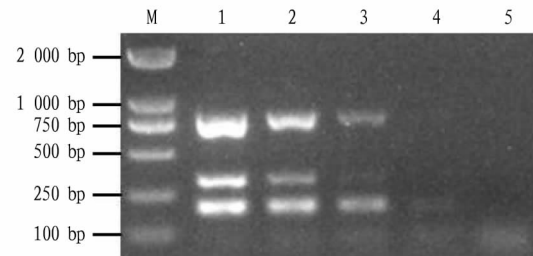
注:M.DL 2000 DNA 分子量标准;泳道1.SPLCV;泳道2.SPFMV;泳道3.SPCSV;泳道4.SPLCV+SPFMV;泳道5.SPLCV+SPCSV;泳道6.SPFMV+SPCSV;泳道7.SPLCV+SPFMV+SPCSV;泳道8.脱毒苗样品

Note:M.DL 2000 DNA Marker; Lane 1.SPLCV; Lane 2.SPFMV; Lane 3.SPCSV; Lane 4. SPLCV + SPFMV; Lane 5. SPLCV + SPCSV; Lane 6.SPFMV+SPCSV; Lane 7.SPLCV+SPFMV+SPCSV; Lane 8.Virus-free seedling

图3 多重PCR的特异性检测

Fig.3 Specificity of multiplex PCR

2.4 多重PCR的灵敏性 灵敏性试验结果表明,建立的多重PCR方法对SPLCV、SPFMV和SPCSV的最低检出浓度为 10^4 拷贝/ μL (图4)。这表明该体系可以实现对以上3种甘薯病毒 10^4 拷贝水平的检测。



注:M.DL 2000 DNA 分子量标准;泳道1~5. 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 拷贝/ μL

Note:M.DL 2000 DNA Marker; Lanes 1~5. 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μL

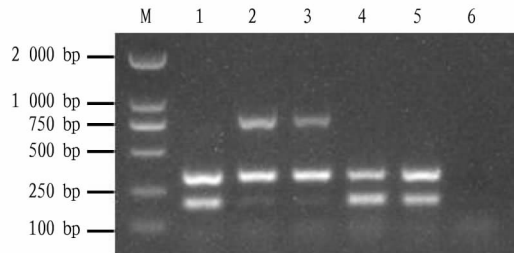
图4 多重RT-PCR的灵敏度

Fig.4 Sensitivity of multiplex PCR

2.5 多重PCR检测方法的应用 利用优化后的多重PCR体系检测甘薯田间样本(图5)。甘薯田间样品多为不同病毒的复合侵染。从图5可见,样品2、3扩增3条目的条带,为SPLCV、SPFMV、SPCSV 3种病毒复合侵染。样品1、4、5扩增出2条目的条带,为SPLCV和SPFMV的复合侵染。该研究建立的多重PCR方法可以在含有不同病毒的甘薯叶片样本中扩增出相应病毒的目的条带,并能够清晰地分辨出SPLCV、SPFMV、SPCSV 3种病毒。

2.6 多重PCR扩增产物的鉴定 将经多重PCR扩增的SPLCV、SPFMV、SPCSV的条带进行测序,并将测序结果与NCBI中的参考病毒基因序列进行同源性比对分析,SPLCV多重PCR扩增产物与日本、美国、广东、山东、四川分离物的核苷酸同源率均在94%及以上,其中,与日本分离物的核苷

酸同源率达到98%(图6a);SPFMV多重PCR扩增产物与澳大利亚、中国、西班牙、日本、韩国分离物核苷酸同源率在94%以上,其中,与澳大利亚分离物核苷酸同源率达到99%(图6b);SPCSV片段与西班牙、河南、山东、广东、四川同源率在97%及以上(图6c)。这说明根据设计的特异性引物建立的多重PCR体系对于3种病毒的检测具有广泛的适用性和可靠性。



注:M.DL 2000 DNA 分子量标准;泳道1~5.甘薯田间样品;泳道6.阴性对照

Note:M.DL 2000 DNA Marker; Lane 1~5.Sweet potato field samples; Lane 6:Negative control

图5 多重PCR的应用

Fig.5 The preliminary application of multiplex PCR

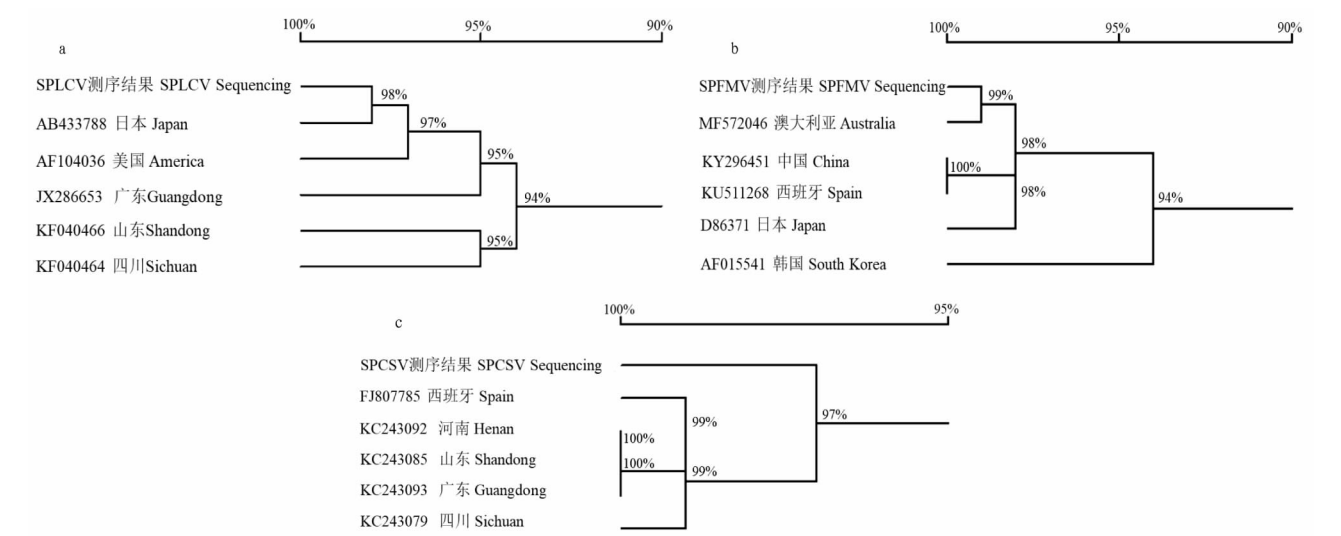
3 讨论与结论

目前核酸扩增技术仍是进行甘薯病毒检测一项快速准确的技术,包括多重PCR技术^[18-21]、荧光定量PCR技术^[22-24]、LAMP恒温扩增技术^[25-27]、RPA重组酶聚合酶扩增技术^[28]等方法。其中,荧光定量PCR技术有更高的灵敏性,但在进行多个病毒检测时需要针对不同病毒设计特异性探针,成本较高;LAMP恒温扩增技术具有特异性高、扩增结果可视化等优点,但却存在引物设计复杂、易产生非特异性扩增等缺点;RPA重组酶聚合酶技术具有反应条件温和、时间短、灵敏度高优点,但作为新兴技术,其研究仍不成熟^[29-31]。因此,多重PCR作为一项兼具费用低廉、操作简单、结果精确等特点的技术,仍是进行多种病毒同时检测经济有效的手段。与单重PCR相比,多重PCR技术可以在同一个反应体系中加入2对及以上的特异性引物,实现多个目的基因同时扩增的目的^[32]。多重PCR的检测会存在不同引物对之间相互抑制或产生非特异性扩增等问题。在建立多重PCR反应体系时,应当合理选择引物,并对反应体系和反应条件不断优化,调整出适宜的反应条件和体系。目前,多重PCR检测体系已广泛应用于甘薯病毒病的检测,王爽等^[18]应用多重PCR检测了菜豆金色花叶病毒属病毒和甘薯褪绿矮化病毒,许泳清等^[19]利用双重RT-PCR检测甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒,蒋素华等^[20]运用多重RT-PCR建立了甘薯的褪绿矮化病毒、潜隐病毒、羽状斑驳病毒的检测体系。

因此,该研究在前人研究的基础上,探索建立检测SPLCV、SPFMV、SPCSV 3种病毒的多重PCR体系。该研究通过参考相关文献^[33],设计不同病毒的特异性引物且各目的片段大小有一定差异,SPLCV、SPFMV和SPCSV 3种病毒目的

条带的大小分别为 180、295 和 774 bp,能有效区分目标病毒,便于检测结果的观察分析。通过对引物浓度的摸索试验,确定了 SPLCV、SPFMV、SPCSV 的上下游引物添加量分别为 0.2 μL/0.2 μL:0.2 μL/0.2 μL:0.5 μL/0.5 μL;退火温度优化和循环数优化试验表明,退火温度为 58 ℃ 时,循环数为 35 次时,扩增效果最好。灵敏度试验和特异性试验表明,建立的多重 PCR 体系可以实现 10⁴ 拷贝/μL 病毒的检测,且具有良好的特异性。该研究采用 2×*Taq* Master mix 预混液极大地优化了操作步骤,并检测 5 份甘薯田间样品,准确、灵敏地检测出复合侵染的甘薯病毒,其中样品 2、3 为 3 种病毒复合侵染,且受 SPLCV 侵染较轻。此外,在样品 2、3 中,SPFMV 的

亮度明显高于 SPCSV,表明样品中 SPFMV 的病毒含量更高,这可能是由于 SPCSV 与 SPFMV 共同侵染甘薯时,SPFMV 病毒含量比单独侵染时增加 600 倍有关^[34]。样品 1、4、5 为 2 种病毒复合侵染。总之,该研究通过选择和设计特异性引物,优化影响多重 PCR 反应的主要条件,建立针对 SPLCV、SPFMV、SPCSV 3 种甘薯病毒的多重 PCR 检测体系,该体系可实现对 3 种甘薯病毒 10⁴ 拷贝/μL 水平的检测,具有良好的特异性和广泛的适用性,可对田间采集的甘薯样品进行快速准确的检测,不仅能够促进甘薯病毒检测技术的发展,还可为甘薯病毒的检测和防控提供技术支持。



注:a.SPLCV 多重 PCR 扩增产物与 SPLCV 参考分离物核苷酸序列的同源率比对;b.SPFMV 多重 PCR 扩增产物与 SPFMV 参考分离物核苷酸序列的同源率比对;c.SPCSV 多重 PCR 扩增产物与 SPCSV 参考分离物核苷酸序列的同源率比对

Note:a.Homology comparison of SPLCV nucleotide sequences;b.Homology comparison of SPFMV nucleotide sequences;c.Homology comparison of SPCSV nucleotide sequences

图 6 多重 PCR 扩增产物的同源率比较
Fig.6 Homology comparison of multiplex PCR amplification products

参考文献

[1] 张有林,张润光,王鑫腾.甘薯采后生理、主要病害及贮藏技术研究[J].中国农业科学,2014,47(3):553-563.

[2] CLARK C A,DAVIS J A,ABAD J A,et al.Sweetpotato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J].Plant disease,2012,96(2):168-185.

[3] LOEBENSTEIN G.Control of sweet potato virus diseases[J].Advances in virus research,2015,91:33-45.

[4] 乔奇,张振臣,张德胜,等.中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测[J].植物病理学报,2012,42(1):10-16.

[5] SOUTO E R,SIM J,CHEN J,et al.Properties of strains of *Sweet potato feathery mottle virus* and two newly recognized potyviruses infecting sweet potato in the United States[J].Plant disease,2003,87(10):1226-1232.

[6] QIAO Q,ZHANG Z C,QIN Y H,et al.First report of *Sweet potato chlorotic stunt virus* infecting sweet potato in China[J].Plant disease,2011,95(3):356.

[7] 刘起丽,张建新,李学成,等.侵染甘薯的 DNA 病毒研究进展[J].植物保护,2017,43(3):36-42.

[8] 孙钟毓,龚莺,赵琳,等.甘薯病毒病害(SPVD)的分子生物学研究进展[J].核农学报,2020,34(1):71-77.

[9] 张成玲,孙厚俊,杨冬静,等.甘薯卷叶病毒对甘薯生长特性及产量的影响[J].北方农业学报,2020,48(4):94-99.

[10] SCHAEFFERS G A.Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria[J].Phytopathology,1976,66(5):642-645.

[11] NGEVE J M,BOUWKAMP J C.Effects of sweet potato virus disease (SPVD) on the yield of sweet potato genotypes in Cameroon[J].Experimental agriculture,1991,27(2):221-225.

[12] 张新新,王旭芳,林坚淳,等.甘薯毁灭性病毒病害(SPVD)的研究进展[J].中国农学通报,2019,35(1):118-126.

[13] 周全卢,张玉娟,黄迎冬,等.甘薯病毒病复合体(SPVD)对甘薯产量形成的影响[J].江苏农业学报,2014,30(1):42-46.

[14] 王爽,刘顺通,韩瑞华,等.不同时期嫁接感染甘薯病毒病(SPVD)对甘薯产量的影响[J].植物保护,2015,41(4):117-120,135.

[15] 李汝刚,蔡少华,SALAZAR L F.中国甘薯病毒的血清学检测[J].植物病理学报,1990,20(3):189-194.

[16] 赵付枚,王爽,田雨婷,等.甘薯病毒病发生关键因素研究[J].中国农业科学,2021,54(15):3232-3240.

[17] CHAMBERLAIN J S,GIBBS R A,RAINER J E,et al.Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J].Nucleic acids research,1988,16(23):11141-11156.

[18] 王爽,田雨婷,乔奇,等.侵染甘薯的菜豆金色花叶病毒属病毒和甘薯褪绿矮化病毒多重 PCR 检测方法的建立与应用[J].植物保护学报,2018,45(6):1427-1428.

[19] 许泳清,李华伟,邱鑫鑫,等.甘薯羽状斑驳病毒和褪绿矮化病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J].福建农业学报,2014,29(11):1114-1117.

[20] 蒋素华,牛苏燕,梁芳,等.甘薯病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立[J].分子植物育种,2020,18(9):2957-2962.

[21] 姜珊珊,冯佳,吴斌,等.3 种甘薯病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].植物病理学报,2018,48(6):847-851.

(下转第 126 页)

石”和“艾拉绒球”的生根效果最佳浓度分别为 50 mg/L IBA、1 000 mg/L IBA+IAA、IBA 250 mg/L+NAA 250 mg/L,可能是由于不同种类和浓度的生长素对藤本月季不同品种扦插不定根的形成效应不同所致。

ABT 生根粉为 IBA 和 NAA 的复合成分,诱导不定根形成的内源激素含量和重要酶活性增加,植物代谢强度增强,达到提高扦插生根的目的。该研究中藤本月季“大游行”的最佳生根效果浓度为 100 mg/L ABT,与对香水月季^[12]、楸树^[13]的研究结果一致。但与对现代月季^[14]、茶树^[15]、红花檵木^[16]的研究结果不一致,其最佳生根浓度为 50 或 200 mg/L ABT,这可能与不同植物的基因型差异有关。ABT 处理后的生根效果比 IBA 和 NAA 好^[17-18],且 ABT 的复合处理比单一处理的生根效果好^[19]。

3.2 试验材料处理的方式或时期不同对不同植物扦插生根的影响 试验材料处理的方式不同,即浸泡处理与速蘸处理的不同,也会影响扦插生根效果。浸泡处理一般长时间低浓度处理,而速蘸处理则用短时间高浓度处理,处理时间过长对月季不定根的形成产生抑制作用。该研究中,藤本月季“大游行”插穗浸泡处理时间为 1 h,生根率较低,仅为 23.73%~51.67%,远低于应用速蘸 1 000 mg/L IBA+IAA 处理“安吉拉”的生根率 90%^[8],速蘸法处理的生根效果优于慢浸法^[20],也有研究指出 IBA 处理 30 min 比处理 60、90 min 显著增加藤本月季“安吉拉”的生根率、生根数和根长^[7],可能是生长素促进不定根形成与处理时间具有阶段效应^[21],长时间处理抑制了不定根的形成,从而降低生根率等。该研究是在 6—7 月高温季节进行,试验期间的平均气温为 30 ℃ 以上,高于月季的最适生长温度 15~25 ℃^[2],可能也是影响扦插生根率低的原因之一,温度过高,抑制了插穗不定根的形成与生长。

该研究相关性分析表明,ABT 浓度与平均生根数量呈正相关,相关系数达 0.853。且主成分分析结果表明,第二主成分主要包括平均生根数量,其载荷为 0.934,因此平均生根数量可作为 ABT 处理扦插生根效果的重要参考指标。而 ABT 浓度与生根率、平均根长、最长根长的相关性较小,仅作为辅助性指标评价。

该研究只是对藤本月季“大游行”在植物生长调节剂 ABT 处理 1 h 下进行了扦插生根效果初步探讨,是否选择不同植物生长调节剂、浓度或处理方式以及选择生理生化指标在“大游行”月季不同生长发育阶段来进行扦插试验,还有待于进一步研究,以提高藤本月季扦插育苗的生产技术。

参考文献

- [1] 张振杰,王超然,卢中营.浅谈藤本月季的栽植技术[J].现代园艺,2019(19):83-84.
- [2] 韩亚利.藤本月季栽培技术及在园林垂直绿化中的造景分析[J].北方园艺,2010(10):132-134.
- [3] 陈向前.藤本月季的应用与管养[J].现代园艺,2021,44(4):116-118.
- [4] 徐晓艳,李文彬.藤本月季生物学特性及抗逆性研究进展[J].现代农业科技,2019(22):82-84.
- [5] 韩文胜.木香与藤本月季软枝扦插技术的研究[J].安徽农学通报,2007,13(13):76-77.
- [6] 杨永花,汉梅兰.IBA 处理对藤本月季插穗生根的影响[J].甘肃农业科技,2011(9):16-17,139.
- [7] 廖伟彪,张美玲,杨永花,等.植物生长调节剂浓度和处理时间对月季扦插生根的影响[J].甘肃农业大学学报,2012,47(3):47-51.
- [8] 龚仲幸.植物生长调节剂对藤本月季扦插生根的影响[J].安徽农业科学,2014,42(28):9719,9724.
- [9] 闻秀娟,黄岳夫,邢海.不同植物生长激素对全光雾插藤本月季的影响[J].现代农业科技,2018(24):150,158.
- [10] 闫海霞,卢家仕,黄昌艳,等.萘乙酸和吲哚丁酸对月季扦插成活效果的影响[J].南方农业学报,2013,44(11):1870-1873.
- [11] 赵燕蓉,李宗艳,王锦.两种藤本月季扦插生根过程中三种相关酶的活性变化[J].北方园艺,2018(2):97-103.
- [12] DE KLERK G J,KEPPEL M,BRUGGE J T,et al.Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings[J].Journal of experimental botany,1995,46(8):965-972.
- [13] LIAO W B,HUANG G B,YU J H,et al.Nitric oxide and hydrogen peroxide are involved in indole-3-butyric acid-induced adventitious root development in marigold[J].Journal of horticultural science&biotechnology,2011,86(2):159-165.
- [14] 冉梦莲,王世成.ABT-6 号生根粉对香水月季扦插生根的影响[J].现代园艺,2016(19):7-8.
- [15] 张蕊,高巨,孙凌玲.ABT 生根粉对楸树硬枝扦插生根率的影响[J].现代农业科技,2020(11):138,140.
- [16] 徐振华,钱金娥,赵少坡,等.现代月季扦插应用新型 ABT 生根粉的试验[J].林业科技开发,1999,13(5):47-48.
- [17] 王雪萍,龚自明,高士伟,等.ABT1 号生根粉对茶树穴盘扦插生根的影响[J].湖北农业科学,2013,52(22):5509-5511.
- [18] 余明光.不同浓度 ABT 生根粉对红花檵木嫩枝扦插生根影响[J].现代园艺,2012(3):3-4,14.
- [19] 莫小锋,秦丽萍,文清岚,等.ABT 生根粉、IBA 和 H₂O₂ 复合处理对台湾果桑扦插生根的影响[J].中国南方果树,2018,47(3):102-106.
- [20] 雷正菊.ABT 生根粉在扦插育苗上的应用研究[J].湖南林业科技,1997,24(2):32-36.
- [21] 林光平.ABT 生根粉在油茶扦插育苗上的试验[J].经济林研究,2005,23(3):36-38.
- [22] 田雨婷,赵晓立,乔奇,等.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.
- [23] 卢会翔,吕长文,吴正丹,等.甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)和甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV)荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国农业科学,2016,49(1):90-102.
- [24] 王丽,王振东,乔奇,等.甘薯褪绿矮化病毒西非株系实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].植物病理学报,2014,44(5):461-468.
- [25] 李华伟,刘中华,张鸿,等.甘薯卷叶病毒 LAMP 快速检测技术的建立及应用[J].农业生物技术学报,2019,27(6):1133-1140.
- [26] 姜珊珊,冯佳,张眉,等.甘薯羽状斑驳病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J].中国农业科学,2018,51(7):1294-1302.
- [27] 乔奇,张振臣,秦艳红,等.甘薯褪绿矮化病毒西非株系 RT-LAMP 检测方法的建立[J].中国农业科学,2013,46(18):3939-3945.
- [28] 许泳清,李华伟,张鸿,等.甘薯卷叶病毒的 RPA 检测方法的建立[J].福建农业学报,2021,36(8):923-926.
- [29] 王亚楠,陈昌国.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].解放军医学杂志,2021,46(5):504-511.
- [30] 王道,张蓬军,孙凯,等.植物检疫性病毒等温扩增检测技术研究进展[J].病毒学报,2021,37(5):1268-1282.
- [31] 罗雪琼,安梦楠,吴元华,等.重组酶聚合酶扩增技术在植物病毒检测中的应用[J].生物技术通报,2022,38(2):269-280.
- [32] 张宝华.PCR 技术在植物生物学中的应用研究[J].生物化工,2020,6(1):130-132.
- [33] 刘志杰,李如举,曾智勇,等.多重 PCR 反应的影响因素及其优化[J].黑龙江畜牧兽医,2011(13):26-28.
- [34] KARYELJA R F,KREUZE J F,GIBSON R W,et al.Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants[J].Virology,2000,269(1):26-36.

(上接第 93 页)