

# 马铃薯 5 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用

罗文彬, 李华伟, 汤浩\*, 邱思鑫\*, 纪荣昌, 许泳清, 刘中华, 邱永祥

(福建省农业科学院作物研究所, 农业部闽台农作物种质资源利用重点开放实验室, 福州 350003)

**摘要:** 采用多重 RT-PCR 方法, 建立可同时检测马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 M 病毒 (PVM)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯 A 病毒 (PVA) 和马铃薯 S 病毒 (PVS) 的方法。根据 GenBank 中 PVX、PVM、PVY、PVA 及 PVS (CP) 基因序列设计特异引物, 对多重 RT-PCR 退火温度、循环次数、延伸温度、引物组合浓度进行优化, 建立了能同时检测 5 种马铃薯病毒的多重 RT-PCR 方法。该方法能同时扩增出 PVX、PVM、PVY、PVA 及 PVS 特异片段, 其大小分别是 138、213、369、468 和 657 bp。测序结果表明, 5 种病毒的序列与相应参考序列相似性达到 97% 以上。灵敏度分析结果表明, 多重 RT-PCR 方法能够检测植物组织量为  $10^{-3}$  mg。应用建立的多重 RT-PCR 检测方法对田间样品和组培苗进行检测, 结果显示, 该方法可以准确、快速、灵敏地同时检测单一或复合侵染的 5 种马铃薯病毒。

**关键词:** 马铃薯; 病毒; 检测方法; 多重 RT-PCR

**中图分类号:** S 532

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 02-0280-09

## Establishment and Application of Multiplex PCR Rapid Detection of Potato Viruses

LUO Wen-bin, LI Hua-wei, TANG Hao\*, QIU Si-xin\*, JI Rong-chang, XU Yong-qing, LIU Zhong-hua, and QIU Yong-xiang

(Institute of Crop Science, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization Between Fujian and Taiwan, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) method was developed for the simultaneous detection of five potato viruses, *Potato virus X*, *Potato virus M*, *Potato virus Y*, *Potato virus A* and *Potato virus S*. Five compatible sets of primers specific for each virus were designed based on conserved sequences of coat protein (CP) gene for multiplex RT-PCR assay. The crucial factors of multiplex RT-PCR including annealing temperature, number of the PCR cycles, extension temperature and primers concentration were optimized for the highest sensitivity and specificity. Five specific fragments were simultaneously amplified in uniplex PCR reaction. Their molecular weights were determined to be 138, 213, 369, 468 and 657 bp. The sequence analysis indicated that the five viruses

收稿日期: 2014-10-17; 修回日期: 2014-12-29

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-10); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队项目 (CXTD-1-1301)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tanghao918@sohu.com; 25273531@qq.com)

shared at least 97% homology with other related viruses. The sensitivity was shown to be capable of positively identifying the five viruses with  $\geq 10^{-3}$  mg of freesia tissue sample. This multiplex RT-PCR protocol can simultaneously detect five potato viruses from field samples and plantlets with accurately, rapidity, sensitivity.

**Key words:** potato; virus; detection method; multiplex RT-PCR

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 为无性繁殖作物, 容易受到病毒的侵染。马铃薯受到病毒侵染后产量和品质严重降低, 一般减产 30% ~ 50%, 严重时减产 90% 以上 (张仲凯 等, 2003; 孙慧生和杨元军, 2004)。据报道, 能侵染马铃薯的有 40 余种病毒和两个类病毒, 其中 9 种病毒和 1 个类病毒对马铃薯影响最为严重 (Barker & Dale, 2006; Palukaitis, 2012; Chung et al., 2013)。中国马铃薯各个产区均有马铃薯病毒病的发生, 常见的主要有马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX), 马铃薯 M 病毒 (*Potato virus M*, PVM)、马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯 A 病毒 (*Potato virus A*, PVA)、马铃薯 S 病毒 (*Potato virus S*, PVS)、马铃薯卷叶病毒 (*Potato leaf roll virus*, PLRV) 和马铃薯纺锤块茎类病毒 (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 等 (胡新喜 等, 2009; Xu et al., 2010; 陈士华 等, 2011; 谢联辉和林奇英, 2011; 高芳奎 等, 2013; 吴兴泉 等, 2013)。目前尚无有效的化学方法防治马铃薯病毒病, 利用茎尖分生组织培育健康无毒的马铃薯已成为预防马铃薯病毒病最为有效的方法之一。种薯生产过程中病毒检测是不可或缺的重要环节, 因此, 建立快速、准确和稳定的马铃薯病毒检测技术有利于加速育种进程, 对保障马铃薯种薯质量和田间马铃薯病毒检测具有重要意义。

基于核酸分子检测的聚合酶链式反应具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点, 目前广泛用于马铃薯病毒检测。近年来, 研究者将多重 RT-PCR 技术运用到马铃薯病毒检测 (孙琦和张春庆, 2005; Peiman & Xie, 2006; Agindotan et al., 2007; 马恢 等, 2007; 刘梅 等, 2009; 阎文昭 等, 2010; Crosslin & Hamlin, 2011; 董代幸 等, 2011; Qiao et al., 2011; 张华鹏 等, 2011; 陈阳婷 等, 2012; Mallik et al., 2012)。与普通 PCR 检测方法相比, 多重 PCR 检测技术能够在一个 RT-PCR 反应中同时检测多种病毒, 操作更为简单, 缩短了检测的时间, 降低了实验成本。但能够检测包含 PVX、PVM、PVY、PVA 和 PVS 的多重 RT-PCR 反应体系少有报道。本研究中利用多重 RT-PCR 技术, 探讨了同时检测 5 种病毒的多重 RT-PCR 技术, 为马铃薯病毒田间检测和脱毒苗诊断奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及其 cDNA 合成

试验于 2013 年 11 月至 2014 年 6 月在农业部闽台农作物种质资源利用重点开放实验室完成。从福建省马铃薯主产区龙海、南安、长乐、福安、霞浦、福州、周宁等地采集带有典型病毒病症状的样品 (表 1)。样品经液氮速冻后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 以无病毒组培苗和 ddH<sub>2</sub>O 作为检测的阴性对照。

植物总 RNA 抽提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒和克隆载体 pMD18-T vector 均购自 TaKaRa 公司。反转录试剂盒 (Thermo Scientific Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。反转录参照试剂盒操作方法进行, 1  $\mu\text{L}$  Primer Oligo(dT)、9  $\mu\text{L}$  DEPC 处理水、2  $\mu\text{L}$  RNA 样品至反应管中, 轻轻混匀再进行离心。将反应管置于 PCR 仪中  $65^{\circ}\text{C}$  反应 5 min 后,

立即将反应管置于冰上 5 min, 之后于上述反应液再加入 4  $\mu\text{L}$   $5\times$  反转录酶缓冲液、1.0  $\mu\text{L}$  ( $40\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 的 RNase 抑制剂、1.0  $\mu\text{L}$  ( $200\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 反转录酶至反应管中, 加入 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP 混合液 ( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 总体积 20  $\mu\text{L}$  轻轻混匀, 再稍微离心, 然后将反应管置于 PCR 仪中  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 5 min。反应结束后冰上冷却备用。

表 1 采样地点及症状  
Table 1 Sampling locations and symptoms

采集地点 Location	样品症状 Sample symptom	品种 Cultivar
福州 Fuzhou	坏死、花叶 Necrosis, mosaic	农家种 Potato landrace
闽侯 Minhou	轻花叶、重花叶、坏死、卷叶、皱缩 Light mosaic, heavy mosaic, necrosis, rolling, shrinkage	紫花 851、福克 212、脱毒 175 Zihua 851, Fuke 212, Tuodu 175
长乐 Changle	轻花叶 Light mosaic	紫花 851 Zihua 851
福安 Fuan	重花叶 Heavy mosaic	农家种 Potato landrace
南安 Nanan	轻花叶 Light mosaic	紫花 851 Zihua 851
霞浦 Xiapu	轻花叶 Light mosaic	中薯 17 号 Zhongshu 17
龙海 Longhai	轻花叶、坏死 Light mosaic, necrosis	紫花 851 Zihua 851
周宁 Zhouning	重花叶、坏死、皱缩 Heavy mosaic, necrosis, shrinkage	农家种 Potato landrace

## 1.2 引物设计

根据 GenBank 公布的马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 M 病毒 (PVM)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯 A 病毒 (PVA) 及马铃薯 S 病毒 (PVS) 5 种病毒的外壳蛋白 (CP) 序列保守区域, 应用 clustalX 软件进行序列比对, 并应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计特异性引物 (表 2), 引物由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 2 马铃薯 5 种病毒检测用引物  
Table 2 Primer sequences developed for the detection of PVX, PVM, PVY, PVA and PVS

GenBank 登录号 Accession number	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	产物大小/bp Product size
AF111193, AB056718, JF430080	PVX-S	CTGGCAAGCACAAGGTTT	138
	PVX-A	TGGGCAGCATTCAATTTCA	
KJ194171, JN835299, KC479343	PVM-S	GCCGACTGAGCACGTGCAGCAGGT	213
	PVM-A	GTCAGCATATGATTCCATGTCACCGG	
AY745491, HQ912866, EF026076	PVY-S	AGAGCAAGGCAGCATCCAGT	369
	PVY-A	TGTTTCATCCCCATCCATCAT	
NC_004039, HM036192, GU256063	PVA-S	ATTAGGTACTGCTGGGACT	468
	PVA-A	TCAGGTGCGTTGAAGAC	
JX419379, HG518653, KC430335	PVS-S	CTTGTGGGCATTGTGAGC	657
	PVS-A	GGCTCAAGCGAGACATTC	

## 1.3 单一 RT-PCR 检测

以反转录产物为模板, 分别利用 PVX、PVM、PVY、PVA、PVS 病毒的特异性引物对样品进行 PCR 扩增。单一 RT-PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 2.0  $\mu\text{L}$  cDNA, 5 种病毒的上游引物 ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 1.0  $\mu\text{L}$ , 1.0  $\mu\text{L}$  5 种病毒的下游引物 ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 0.15  $\mu\text{L}$  Ex Taq ( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP ( $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$   $10\times$  PCR buffer, ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环 30 次; 最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4 多重 RT-PCR 检测体系优化和建立

在单一 RT-PCR 的基础上对多重 RT-PCR 反应体系进行优化, 设定某一影响因素时, 其它因素不变。在同一 PCR 反应体系中同时加入 5 对引物进行 5 重 PCR 反应, 对多重 RT-PCR 体系中引物浓度 (表 3)、退火温度 (52、54、56、58 和 60 ℃)、延伸温度 (68、70 和 72 ℃)、循环次数 (20、25、30、35 次) 等因素进行试验。

表 3 多重 RT-PCR 引物浓度组合					
Table 3 Combinations of primer sets for multiplex RT-PCR					
处理组合 Treatment combination	引物浓度 Primer concentration				
	PVX S/A	PVM S/A	PVY S/A	PVA S/A	PVS S/A
1	0.12	0.12	0.08	0.04	0.10
2	0.20	0.08	0.20	0.04	0.10
3	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
4	0.24	0.06	0.20	0.10	0.10
5	0.24	0.04	0.24	0.12	0.16
6	0.24	0.06	0.08	0.08	0.16

1.5 PCR 产物电泳分析

PCR 反应结束后, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。上样量为 5 μL, 120 V 稳压电泳 30 min, 凝胶成像仪观察拍照。

1.6 灵敏度检测

提取感染的马铃薯病毒植株总 RNA, 取 5 μL 总 RNA 稀释 10 倍, 用 DU800 型核酸蛋白分析仪测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>, 并计算总 RNA 浓度。然后对总 RNA 进行 10 倍梯度稀释, 10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>, 经过多重 RT-PCR 扩增, 观察电泳结果, 分析多重 RT-PCR 检测的灵敏性, 对单一和多重 RT-PCR 进行灵敏度试验。

1.7 PCR 产物的克隆与序列分析

多重 RT-PCR 扩增产物用大连宝生物公司 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后获得阳性克隆。

获得的阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。NCBI 上 BLAST 对所测序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及单一 RT-PCR 检测结果

5 种病毒 (PVX、PVM、PVY、PVA 和 PVS) 各设计 3 对引物, 利用软件 DNAMAN 检测引物间的互补性及引物退火温度, 选择退火温度接近, 且扩增的目的片段大小有明显差异, 易于区分的引物对。

用筛选的 PVX、PVM、PVY、PVA 和 PVS 引物 (表 2) 分别对相应病毒的 RNA 模板进行单一 RT-PCR 扩增, 分别能够扩增出 138、213、369、468 和 657 bp 特异性条带, 符合相应病毒的理论预

期值。

将 5 对引物混合在同一个反应体系中, 以 5 种病毒的 RNA 作模板, 如图 1 所示, 均能够同时扩增出对应的特异条带, 无杂带出现, 说明这 5 对引物特异性好, 无交叉和相互干扰现象, 适合多重检测。

## 2.2 多重 RT-PCR 反应体系优化

在单一 RT-PCR 的基础上, 对 5 种病毒引物浓度、PCR 退火温度、PCR 延伸温度、PCR 循环次数进行了优化试验。5 种病毒引物浓度

优化试验结果见图 2, 按  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的终浓度加入 5 对引物, 结果显示 PVX、PVY 片段较弱 (图 2, A, 泳道 3), 将 PVX 和 PVY 引物浓度提高到  $0.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其他引物浓度减低, PVX 和 PVY 随着引物浓度的提高条带逐渐变亮, 当处理 5 (PVX、PVY、PVM、PVA 和 PVS) 引物浓度分别为  $0.24$ 、 $0.04$ 、 $0.24$ 、 $0.12$  和  $0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 5 种病毒扩增条带均较亮 (图 2, A, 泳道 5), 最终确定上述 5 种马铃薯病毒 PVX、PVY、PVM、PVA 和 PVS 引物浓度比为  $0.24:0.04:0.24:0.12:0.16$ 。当退火温度为  $52^\circ\text{C}$  时, 4 种病毒的目的条带均较暗; 退火温度为  $54$ 、 $56$ 、 $58$  和  $60^\circ\text{C}$  时, 扩增出的目的条带亮度较高 (图 2, B), 综合考虑退火温度选择  $58^\circ\text{C}$  作为多重 RT-PCR 的退火温度。PCR 循环次数为 20 和 25 次时, PVX、PVY、PVM、PVA 和 PVS 目的条带不清晰, 提高 PCR 循环次数到 30 和 35 次时, 5 种病毒均可获得清晰的目的条带 (图 2, C)。延伸温度试验表明, 3 个延伸温度均能扩增出 5 种病毒清晰的目的条带, 综合考虑选择  $72^\circ\text{C}$  延伸温度 (图 2, D)。

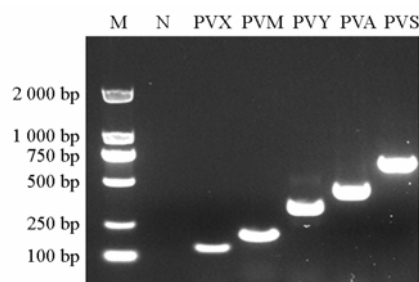


图 1 单一 PCR 检测 5 种马铃薯病毒

M: DNA 标准分子量; N: 阴性对照。

Fig. 1 Detection of five potato viruses by uniplex PCR

M: Marker DL2000; N: Negative control.

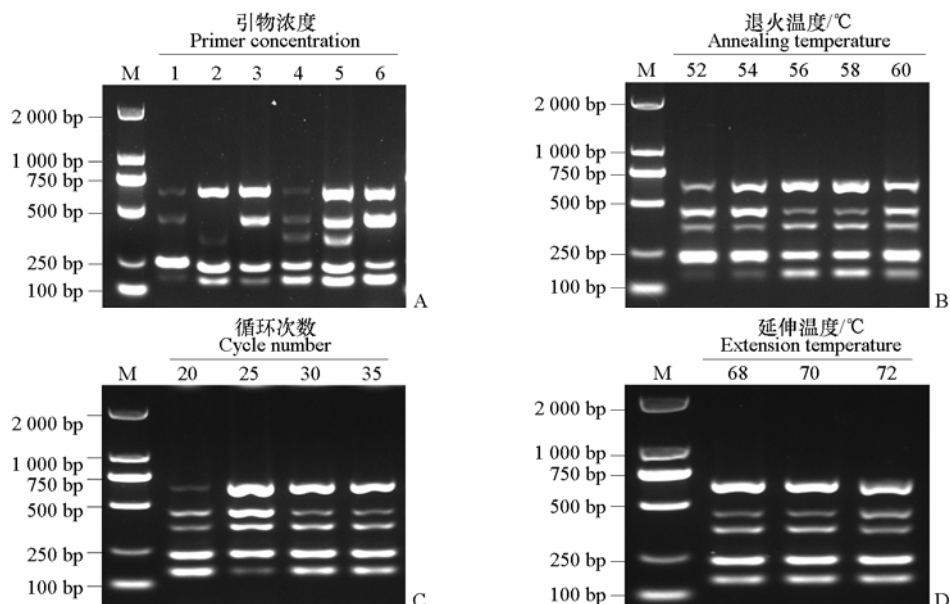


图 2 多重 RT-PCR 反应体系优化

M: DNA 标准分子量; A: 泳道 1~6 见表 3。

Fig. 2 Effects of the reaction components in multiplex RT-PCR

M: Marker DL2000; A: Lane 1 - 6 are shown in Table 3.

## 2.3 多重 RT-PCR 反应体系确立

根据上述试验结果, 确定 5 种马铃薯病毒的多重 RT-PCR 反应体系和反应程序。多重 RT-PCR 反应体系 (25  $\mu$ L) 为: 2.0  $\mu$ L cDNA, 0.6  $\mu$ L PVX 引物, 0.10  $\mu$ L PVM 引物, 0.6  $\mu$ L PVY 引物, 0.3  $\mu$ L PVA 引物, 0.4  $\mu$ L PVS 引物, 0.15  $\mu$ L Ex *Taq* ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu$ L dNTP ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu$ L  $10\times$  PCR buffer, ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环 30 次。利用建立的反应体系对 PVX、PVM、PVY、PVA、PVS 进行单一和多重 RT-PCR 扩增, 5 种病毒的目的条带均清晰分明 (图 3)。

## 2.4 灵敏度检测

将提取的马铃薯总 RNA 按照 10 倍梯度稀释法依次稀释, 在相同反应体系及反应条件下分别对单一和多重 RT-PCR 灵敏度进行分析。由图 4 可知, 单一 RT-PCR 灵敏度检测为 PVX、PVM、PVY、PVA 和 PVS 在模板稀释  $10^{-4}$  后仍能检测到扩增条带清晰, 检测灵敏度相当于  $10^{-4}$  mg 组织量, 样品组织量为  $10^{-5}$  mg 时检测条带微弱。多重 RT-PCR 检测模板浓度为  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  时检测条带微弱, 综上所述多重 RT-PCR 检测灵敏度为  $10^{-3}$  mg 新鲜组织量, 单一 RT-PCR 检测灵敏度为多重 RT-PCR 的 10 倍。

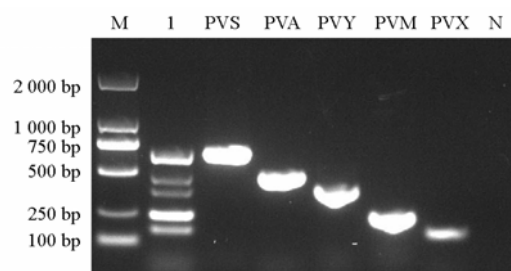


图 3 5 种马铃薯病毒单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 扩增结果  
M: DNA 标准分子量; 泳道 1: PVX、PVM、PVY、PVA 和 PVS 混合; N: 阴性对照。

Fig. 3 Detection of potato viruses by uniplex and multiplex RT-PCR

M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Multiplex of PVX, PVM, PVY, PVA and PVS; N: Negative control.

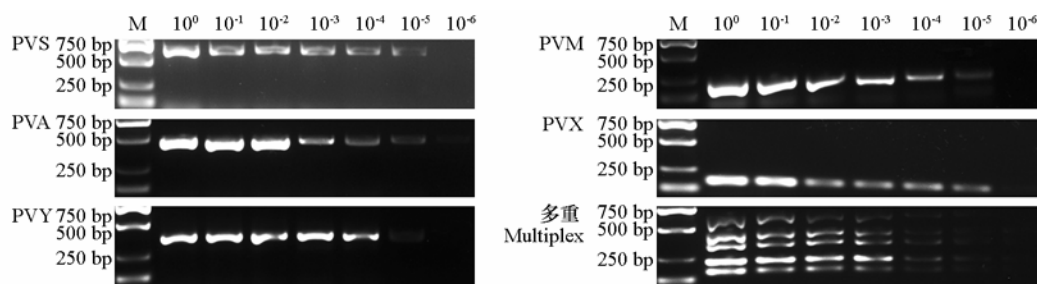


图 4 单一和多重 RT-PCR 的灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivities analysis of the uniplex and multiplex RT-PCR

## 2.5 田间样品症状及样品检测

田间采集病样时发现侵染病毒的马铃薯植株出现植株矮化、畸形, 叶片表现为轻花叶、皱缩、重花叶、叶脉坏死等症状, 收获考种时发现受侵染的马铃薯薯块出现薯块变小、裂纹、畸形等症状。经调查发现, 病毒病的发生与当地种植种薯脱毒与否有关, 其中春种区和秋种区均为农民自留种种薯, 马铃薯病毒症状类型复杂, 发病率达 80% 以上, 且多为几种病毒的复合侵染, 而种植脱毒种薯冬种区马铃薯病毒病症状类型单一, 发病较轻, 多为 1 种或两种病毒侵染。

利用建立的多重 RT-PCR 检测田间和茎尖脱毒苗样品 (图 5)。田间样品多为几种病毒复合侵染, 样品 1 和样品 6 为 PVX、PVM、PVY 和 PVA 复合侵染, 样品 3、4 和 7 为 PVM、PVY、PVA 和 PVS

复合侵染, 样品 2 为 PVY、PVA 和 PVS 复合侵染, 样品 5 为 PVM、PVA 和 PVS 复合侵染; 8 株茎尖脱毒苗中有 4 份样品脱毒彻底, 4 份样品脱毒不彻底, 其中样品 10、11 和 12 中 PVM 病毒未脱除, 样品 11 和 12 PVM 和 PVA 未脱除, 样品 13 PVS 未脱除。经田间样品检测表明, 本研究中建立的多重 RT-PCR 检测体系可以高效快速地检测出马铃薯受侵染的 5 种病毒。在进行多重 RT-PCR 检测的同时, 运用单一 RT-PCR 进行验证, 单一和多重 RT-PCR 检测结果一致。

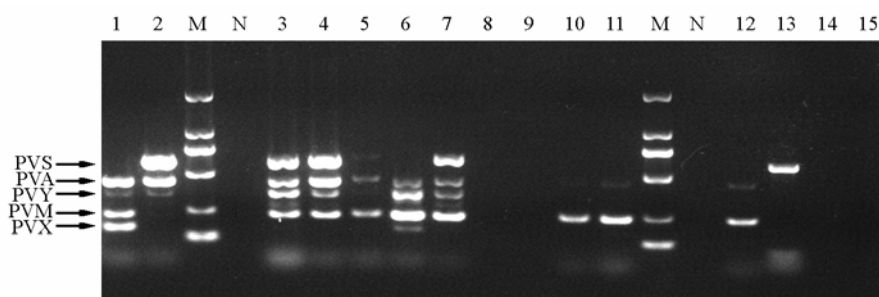


图 5 马铃薯田间样品和组培苗检测结果

M: DNA 标准分子量; 泳道 1~7: 田间样品; 泳道 8~15: 经茎尖脱毒的组培苗; N: 阴性对照。

Fig. 5 Detection results of field samples and plantlets by multiplex RT-PCR

M: DL2000 DNA marker; Lane 1 - 7: Detection results of samples from field; Lane 8 - 15: Detection results of samples from plantlets; N: Negative control.

### 3 讨论

ELISA 检测法是目前植物病毒检测最常用的方法, 由于其检测成本低廉、快速和特异性高、适合处理大批样品检测等优点, 在马铃薯病毒检测中得到广泛应用 (高艳玲 等, 2001; 宋吉轩 等, 2006; 钟婷婷 等, 2008; Hamm et al., 2010; 范国权 等, 2013; Yang et al., 2014)。然而, 该方法具有一定的局限性, 一种抗血清只能检测一种病毒, 检测程序繁琐, 而且还存在一定程度的假阳性, 检测灵敏性相对较低。为了提高病毒检测效率, RT-PCR 检测技术得到了迅速的推广和应用, 特别是一次反应能同时检测多种病毒的多重 RT-PCR (M-RT-PCR) 检测技术在马铃薯病毒检测上得到了较好应用 (Nie & Singh, 2001; Ipsita et al., 2012; Singh et al., 2013)。Agindotan 等 (2007) 利用实时荧光定量 RT-PCR 检测 4 种马铃薯病毒, 检测灵敏度相当于 200~400 倍病毒 RNA 拷贝, 检测灵敏度较高, 适合病毒的定量研究。但荧光定量 PCR 检测成本较高。多重 RT-PCR 检测技术具有在一个 RT-PCR 反应中可同时检测多种病毒, 具有较高的检测灵敏度, 操作更为简单, 缩短了检测的时间与降低了试验成本等优点。

本研究中在单一 RT-PCR 基础上, 对多重 RT-PCR 引物浓度进行调整, 获得一个合适浓度, 同时优化了 PCR 反应条件和参数, 最终建立多重 RT-PCR 检测方法, 实现 5 种病毒的同时快速检测, 并且具有良好的特异性, 为马铃薯病毒检测提供了快速、灵敏、准确的方法。

### References

- Agindotan B O, Shiel P J, Berger P H. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142: 1 - 9.
- Barker H, Dale M F B. 2006. Resistance to viruses in potato//Loebenstein G, Garr J P. Natural resistance mechanisms of plants to viruses. New York: Springer: 341 - 366.

- Chen Shi-hua, Liu Xiao-lei, Zhang Xiao-ting, Wu Xing-quan. 2011. Study on the PVY strain differentiation and identification of some potato producing areas in China. *Journal of Henan Agricultural University*, 45 (5): 548 - 551. (in Chinese)
- 陈士华, 刘晓磊, 张晓婷, 吴兴泉. 2011. 中国部分马铃薯产区马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的株系分化与鉴定. *河南农业大学学报*, 45 (5): 548 - 551.
- Chen Yang-ting, Sang You-shun, Feng Yan, Chen Tao. 2012. Quick detection of potato viruses by duplex RT-PCR. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 25 (1): 179 - 182. (in Chinese)
- 陈阳婷, 桑有顺, 冯 焱, 陈 涛. 2012. 双重 RT-PCR 法快速检测多种马铃薯病毒的研究. *西南农业学报*, 25 (1): 179 - 182.
- Chung B N, Yoon J Y, Palukaitis P. 2013. Engineered resistance in potato against *Potato leaf roll virus*, *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Virus Genes*, 47: 86 - 92.
- Crosslin J M, Hamlin L L. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. *Am J Pot Res*, 88: 333 - 338.
- Dong Dai-xing, Zhang Xiang-lin, Luo Ming, Han Jian, Feng Shi-qiang, Tang De-xian, Yue Zhong-hai. 2011. Development of one step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four potato viruses. *Microbiology*, 38 (1): 131 - 137. (in Chinese)
- 董代幸, 张祥林, 罗 明, 韩 剑, 冯世强, 唐德贤, 岳仲海. 2011. 马铃薯病毒一步法多重 RT-PCR 检测技术的构建. *微生物学通报*, 38 (1): 131 - 137.
- Fan Guo-quan, Bai Yan-ju, Gao Yan-ling, Zhang Wei, Zhang Shu, Shen Ning, Liu Kai, Yu Jiang. 2013. Investigation and analysis on potato viral disease in China. *Journal of Northeast Agricultural University*, 44 (7): 74 - 79. (in Chinese)
- 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 张 威, 张 抒, 申 宁, 刘 凯, 喻 江. 2013. 中国马铃薯主要病毒发生情况调查与分析. *东北农业大学学报*, 44 (7): 74 - 79.
- Gao Fang-luan, Shen Jian-guo, Shi Feng-yang, Fang Zhi-guo, Xie Lian-hui, Zhan Jia-sui. 2013. Detection and molecular variation of potato virus Y CP gene in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 46 (15): 3125 - 3133. (in Chinese)
- 高芳鸾, 沈建国, 史凤阳, 方志国, 谢联辉, 詹家绥. 2013. 中国马铃薯 Y 病毒的检测鉴定及 CP 基因的分子变异. *中国农业科学*, 46 (15): 3125 - 3133.
- Gao Yan-ling, Zhang Wei, Bai Yan-ju, Shen Yu, Fan Guo-quan, Geng Hong-wei, Liu Wei-ting. 2001. Investigation and analysis of viral diseases in main potato production areas. *Plant Protection*, 37 (3): 149 - 151. (in Chinese)
- 高艳玲, 张 威, 白艳菊, 申 宇, 范国权, 耿宏伟, 刘玮婷. 2001. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查分析. *植物保护*, 37 (3): 149 - 151.
- Hamm P B, Hane D C, Pavek M J, Leroux L D, Gieck S L, David N L. 2010. Potato cultivars differ in current season *Potato virus Y* (PVY) infection. *American Journal of Potato Research*, 87 (1): 19 - 26.
- Hu Xin-xi, He Chang-zheng, Xiong Xing-yao, Liu Yue-ming, Song Yong, Nie Xian-zhou. 2009. Advances on *Potato virus Y* research. *Chinese Potato Journal*, 23 (5): 293 - 300. (in Chinese)
- 胡新喜, 何长征, 熊兴耀, 刘月明, 宋 勇, 聂先舟. 2009. 马铃薯 Y 病毒研究进展. *中国马铃薯*, 23 (5): 293 - 300.
- Ipsita Mallik, Nolan R Anderson, Neil C Gudmestad. 2012. Detection and differentiation of *Potato virus Y* strains from potato using immunocapture multiplex RT-PCR. *American Journal of Potato Research*, 89 (3): 184 - 191.
- Liu Mei, Huang Xin, Ma Zhan-hong, Chen Hong-jun, Li Ming-fu. 2009. Multiplex RT-PCR for detection of potato viruses with a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39 (4): 431 - 434. (in Chinese)
- 刘 梅, 黄 新, 马占鸿, 陈洪俊, 李明福. 2009. 应用 DPO 引物检测马铃薯病毒的多重 RT-PCR 技术研究. *植物病理学报*, 39 (4): 431 - 434.
- Ma Hui, Xie Xiao-liang, Yin Jiang, Wen Chun-xiu, Wu Zhi-ming. 2007. Duplex RT-PCR detection of *Potato spindle tuber viroid* with an internal control of potato ND2 mRNA. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (5): 1213 - 1216. (in Chinese)
- 马 恢, 谢晓亮, 尹 江, 温春秀, 吴志明. 2007. 以马铃薯 ND2 mRNA 为内对照双重 RT-PCR 法检测马铃薯纺锤块类病毒. *园艺学报*, 34 (5): 1213 - 1216.
- Mallik I, Anderson N R, Gudmestad N C. 2012. Detection and differentiation of *Potato virus Y* strains from potato using immunocapture multiplex RT-PCR. *Am J Pot Res*, 89: 184 - 191.
- Nie X, Singh R P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods*, 91 (1): 37 - 49.

- Palukaitis P. 2012. Resistance to viruses of potato and their vectors. *Plant Pathol*, 28 (3): 248 - 258.
- Peiman M, Xie C. 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. *Australasian Plant Disease Notes*, 1: 41 - 46.
- Qiao Nan, Cao Jia, Li Xia. 2011. Establishment of multiplex PCR for three virus of potato. *Agricultural Science Technology*, 12 (8): 1209 - 1212.
- Singh Mathuresh, Singh Rudra P, Fageria M S, Nie X, Coffin Robert, Hawkins G. 2013. Optimization of a real-time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of *Potato virus Y* in dormant potato tubers. *American Journal of Potato Research*, 90 (1): 43 - 50.
- Song Ji-xuan, Fan Shi-jie, Dong Ying-ping, Yan Qian, Zhang Min, Zhang De-yu. 2006. Potato virus determined by the improved DAS-ELISA technique. *Guizhou Agricultural Sciences*, 34 (5): 69 - 70. (in Chinese)
- 宋吉轩, 范士杰, 董颖苹, 颜 谦, 张 敏, 张德宇. 2006. 应用改进的 DAS-ELISA 法快速检测马铃薯病毒. *贵州农业科学*, 34 (5): 69 - 70.
- Sun Hui-sheng, Yang Yuan-jun. 2004. Seed potato production in China//Proceedings of the Fifth World Potato Congress: 182 - 186. (in Chinese)
- 孙慧生, 杨元军. 2004. 中国马铃薯种薯生产//第五届世界马铃薯大会会议论文集: 182 - 186.
- Sun Qi, Zhang Chun-qing. 2005. Studies on the methods of detecting PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>O</sup> by RT-PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (1): 213 - 216. (in Chinese)
- 孙 琦, 张春庆. 2005. PVY<sup>N</sup>与 PVY<sup>O</sup>病毒 RT-PCR 快速检测体系研究. *中国农业科学*, 38 (1): 213 - 216.
- Wu Xing-quan, Zhang Hui-cong, Shi Yan, Sun Qiang, Chen Shi-hua. 2013. Survey of important potato viruses in some potato planting areas in China. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 42 (7): 84 - 87. (in Chinese)
- 吴兴泉, 张慧聪, 时 妍, 孙 强, 陈士华. 2013. 我国部分马铃薯产区主要病毒病发生情况调查. *河南农业科学*, 42 (7): 84 - 87.
- Xie Lian-hui, Lin Qi-ying. 2011. *Plant virology*. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press: 154 - 155. (in Chinese)
- 谢联辉, 林奇英. 2011. *植物病毒学*. 3 版. 北京: 中国农业出版社: 154 - 155.
- Xu H M, Aubin J D, Nie J B. 2010. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. *Virology Journal*, 25 (7): 2 - 7.
- Yan Wen-zhao, Pu Zhi-gang, Zhong Ting-ting. 2010. Establishment of Sichuan potato virus detection by RT-PCR. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 23 (6): 2171 - 2173. (in Chinese)
- 阎文昭, 蒲志刚, 钟婷婷. 2010. 四川省马铃薯病毒 RT-PCR 检测体系的建立. *西南农业学报*, 23 (6): 2171 - 2173.
- Yang Li-Jie, Nie Bi-hua, Liu Jun, Song Bo-tao. 2014. A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets in vitro using ELISA and quantitative RT-PCR. *American Journal of Potato Research*, 91 (3): 304 - 311.
- Zhang Hua-peng, Zhang Jian-feng, Liu Jun-ying, Wang Cong-cong. 2011. Triplex-RT-PCR Detection of PVY, PVS and PLRV in potato. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 26 (5): 40 - 45. (in Chinese)
- 张华鹏, 张剑峰, 刘俊莹, 王聪聪. 2011. 马铃薯上 PVY、PVS 和 PLRV 的三重 RT-PCR 检测. *华北农学报*, 26 (5): 40 - 45.
- Zhang Zhong-kai, Ding Ming, Fang Qi, Zhang Li-zhen, Peng Lu-bo, Li Zhan, Li Ting-ting. 2003. Virus species infected potato and screening system of virus-free seedling. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, (S1): 178 - 185. (in Chinese)
- 张仲凯, 丁 铭, 方 琦, 张丽珍, 彭璐波, 李 展, 李婷婷. 2003. 云南马铃薯病毒种类及脱病毒种苗筛选技术体系. *云南农业科技*, (S1): 178 - 185.
- Zhong Ting-ting, Pu Zhi-gang, He Jun-rong, Wu Jie, Yang Chun-lin, Yan Wen-zhao. 2008. The latest investigation and serological detection of potato viruses in Sichuan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 21 (1): 96 - 99. (in Chinese)
- 钟婷婷, 蒲志刚, 何俊蓉, 吴 洁, 杨春林, 闫文昭. 2008. 四川省马铃薯主产区最新病毒普查及血清学鉴定. *西南农业学报*, 21 (1): 96 - 99.