

宋起萱,浦艳飞,余蓉培,等. 蝴蝶兰建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2023,51(15):21-28.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.15.004

蝴蝶兰建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的实时荧光定量 PCR 检测

宋起萱¹, 浦艳飞¹, 余蓉培^{2,3}, 瞿素萍^{2,3}, 杨春梅^{2,3}, 吴丽芳^{2,3}, 汪国鲜^{2,3}, 阮继伟^{2,3}

(1. 云南大学资源植物研究院, 云南昆明 650504; 2. 云南省农业科学院花卉研究所/国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南昆明 650205;
3. 玉溪云星生物科技有限公司, 云南玉溪 653100)

摘要:建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, 简称 CymMV)和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, 简称 ORSV)是蝴蝶兰生产中的主要病毒病害,建立稳定、灵敏的检测体系是进行病毒早期检测和脱毒技术研究的前提。本研究首先对 CymMV 和 ORSV 的外壳蛋白(coat protein, 简称 CP)基因片段进行克隆和序列比对,随后设计特异性引物,分别构建 2 种病毒的 RT-qPCR(real time quantitative PCR, 简称 RT-qPCR)检测体系,并对云南地区 20 份样品进行检测。研究结果显示,CymMV 和 ORSV CP 基因序列与其他地区分离物中这 2 种病毒的核苷酸序列相似性分别为 97.92%~98.66% 和 99.12%~99.56%,其 CP 基因序列具有保守性。CymMV 和 ORSV 在 RT-qPCR 体系中最低检出浓度分别为 30.9、35.0 copies/ μL ,灵敏度较 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction, 简称 RT-PCR)提高 10 倍。利用 RT-qPCR 体系对 20 份温室样品进行检测,CymMV 阳性率为 100%,ORSV 阳性率为 90%,阳性率均高于 RT-PCR 检测结果。本研究构建的 CymMV 和 ORSV RT-qPCR 检测体系将为蝴蝶兰病毒病早期监测和脱毒种苗的培育奠定基础。

关键词:蝴蝶兰;建兰花叶病毒;齿兰环斑病毒;实时荧光定量 PCR;病毒检测

中图分类号:S436.8⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)15-0021-08

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)是一种原产于热带

亚热带地区的附生兰科植物,形态高雅、花期较长,是世界重要的花卉种类之一^[1-2]。商品销售的蝴蝶兰多采用组织培养方法繁殖,长期无性繁殖使得病毒积累严重。目前,能够感染兰花的病毒有 50 多种,其中,建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, 简称 CymMV)和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, 简称 ORSV)是兰花中感染较为严重和普遍的 2 种病毒^[3-4]。蝴蝶兰植株感染 CymMV 和 ORSV

收稿日期:2022-11-06

基金项目:云南省重大科技专项计划(编号:202102AE090052);云南大学专业学位研究生实践创新基金(编号:ZC-22222419)。

作者简介:宋起萱(1999—),女,四川攀枝花人,硕士研究生,研究方向为观赏植物研究。E-mail:songqixuan0218@126.com。

通信作者:余蓉培,博士,副研究员,研究方向为观赏植物研究, E-mail:yongpei@126.com;瞿素萍,硕士,研究员,研究方向为花卉组培繁育,E-mail:qsp@yaas.org.cn。

of Molecular Sciences,2022,23(5):2586.

[12]王铁固,马娟,张怀胜,等.玉米雄穗主轴长度和分枝数的主基因+多基因遗传分析[J].核农学报,2012,26(2):280-287.

[13]Mock J J,Schuetz S H. Inheritance of tassel branch number in Maize I[J]. Crop Science,1974,14(6):885-888.

[14]陈俊宇,卢峰,陈婉莹,等.玉米生育期相关性状 QTL 定位[J].江苏农业科学,2022,50(8):63-68.

[15]刘欢欢,王艳,陈婉莹,等.玉米穗位叶快速叶绿素荧光参数及产量相关性状 QTL 定位[J].分子植物育种,2022,20(6):1872-1882.

[16]Wang D F,Portis A R. Increased sensitivity of oxidized large isoform of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

(rubisco) activase to ADP inhibition is due to an interaction between its carboxyl extension and nucleotide-binding pocket[J]. Journal of Biological Chemistry,2006,281(35):25241-25249.

[17]McCouch S R,Cho Y G,Yano M,et al. Report on QTL nomenclature[J]. Rice Genetics Newsletter,1997,14:11-13

[18]刘军霞,何小娟,刘婷婷.不同环境下玉米雄穗分枝数和主轴长的 QTL 分析[J].分子植物育种,2018,16(10):3219-3226.

[19]陈正杰.玉米雄穗分枝数数量遗传分析及 QTL 定位[D].雅安:四川农业大学,2014.

[20]高晶,李海灵,田然,等.玉米雄穗相关性状 QTL 分析[J].玉米科学,2022,30(2):35-41,50.

[21]白成银.玉米雄穗分枝数的 QTL 定位[D].雅安:四川农业大学,2013.

后,叶片分别会出现黄色环斑和条纹花斑,花朵出现褪色,使观赏价值极大降低,造成巨大经济损失,严重制约了我国蝴蝶兰产业的发展^[5]。因此,亟待建立快速准确的 CymMV 和 ORSV 检测体系,为蝴蝶兰带病毒植株的早期鉴定以及种苗脱毒体系的构建提供可靠的技术保障。

CymMV 和 ORSV 是正义单链 RNA 病毒[(+) ssRNA]^[3]。CymMV 隶属于线形病毒科(Flexiviridae)马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*),病毒粒子由外壳蛋白和正义单链 RNA 基因组组成,基因组全长 6.3 kb,包含 5 个开放阅读框(ORF),ORF5 编码 24 ku 外壳蛋白^[6-8]。ORSV 隶属于烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*),直杆状颗粒,病毒粒子分散在细胞质内呈晶格排列,基因组全长 6 618 bp,具有 5 个 ORF,ORF5 编码 18 ku 外壳蛋白^[3,9-10]。

目前,CymMV 和 ORSV 的检测方法主要有电镜法、血清学方法和分子生物学方法^[11-12]。其中,分子生物学方法是从核酸水平来检测病毒,可以进行大批量的样品检测,具有灵敏度高、特异性强、检测速度快、操作简便等优点^[11]。实时荧光定量 PCR(real time quantitative polymerase chain reaction,简称 RT-qPCR)是分子生物学检测法中一种高效、稳定、准确的检测技术,它是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最终通过标准曲线可对未知模板进行准确定量分析^[13]。灵敏度是 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction,简称 RT-PCR)的 10~1 000 倍^[14-17]。该技术在蔬菜、花卉、果树等园艺植物病毒检测中有广泛应用^[18-21]。但目前对于蝴蝶兰 CymMV 和 ORSV 的 RT-qPCR 检测方法尚缺乏深入报道。

本研究分别对 CymMV 和 ORSV 外壳蛋白(coat protein,简称 CP)编码基因设计特异性引物,克隆 CP 基因片段序列,构建 CymMV 和 ORSV 质粒标准品,进而分别建立 CymMV 和 ORSV 的 RT-qPCR 检测体系,并应用于云南温室栽培蝴蝶兰的 CymMV 和 ORSV 检测。该体系将为蝴蝶兰规模化生产中 CymMV 和 ORSV 准确高效检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

使用云南省农业科学研究院花卉研究所九溪基地保存的 CymMV 和 ORSV 感病植株作为植物材

料,于 2022 年 3 月在云南省花卉育种重点实验室进行 CymMV 和 ORSV 的外壳蛋白基因片段克隆。用于检测的温室植株亦种植于云南省农业科学院花卉研究所九溪基地。

1.2 总 RNA 提取与反转录

使用艾德莱生物的多糖多酚复杂植物 RNA 快速提取试剂盒进行蝴蝶兰叶片总 RNA 提取。用 ND2000-超微量紫外可见光分光光度计测定 RNA 浓度、 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性。

使用 PrimeScript IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒(TaKaRa)对 RNA 进行反转录,在 RNase Free 管中加入 2 μL 模板 RNA、2 μL Primescript IV cDNA synthesis Mix、6 μL ddH₂O 配制混合液。混合液在 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后,70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,得到 cDNA 溶液保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,可用于 PCR 和 RT-qPCR。

1.3 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因片段克隆与序列分析

在 NCBI 上查找 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因序列,使用 NCBI 的 Primer-BLAST 设计引物(表 1),并由北京擎科生物科技有限公司进行引物合成。以感染 CymMV 和 ORSV 植株的 cDNA 为模板,使用诺唯赞 Green Taq Mix 试剂盒和表 1 中的引物对 CP 基因片段克隆。反应体系如下:0.5 μL 模板 cDNA,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,5 μL Green Taq Mix,3.5 μL ddH₂O。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。测序结果使用 DNAMAN 软件进行序列分析。

表 1 CymMV 与 ORSV 的 CP 基因片段克隆引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度 (bp)	产物长度 (bp)
CymMV-F	CCGGTCACCTCATCAATCGCCA	22	534
CymMV-R	TGCAGGCAGAGCATAGAGGGTG	22	
ORSV-F	GCTTGGGCTGACCCCCAATTCACT	23	235
ORSV-R	GGATTCTGCGGATTTTCTACCTCG	24	

1.4 质粒标准品制备

将 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因片段克隆得到的 PCR 产物使用全式金公司的 Easy Pure® Quick Gel Extration Kit 进行切胶回收并纯化。将回收纯化

后的产物与 pEASY® - T3 Cloning Kit 进行载体连接,随后转化到 Trans1 - T1 Phage Resistant 感受态细胞中,37 ℃、200 r/min 培养 1 h 后,将菌液均匀涂于含有 50 mg/L 氨苄青霉素 LB 平板上,37 ℃ 倒置培养 12 h,随后挑取单菌落于 50 mg/L 氨苄青霉素 LB 液体培养基中扩大培养。将得到的菌液进行 PCR,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鉴定,选取条带明亮且正确的菌液送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

选择测序结果正确的菌液,使用全式金公司 Easy Pure® Plasmid MiniPrep Kit 分别提取质粒,并放置于 -20 ℃ 保存,将其作为 CymMV 和 ORSV 质粒标准品使用。运用公式 $C = A \times 10^{-9} \times B^{-1} \times 6.02 \times 10^{23}$ (A 为质粒浓度,ng/μL; B 为质粒 DNA 分子量; C 为质粒标准品浓度,copies/μL; 6.02×10^{23} 为摩尔分子数)计算出 CymMV 和 ORSV 质粒标准品浓度分别为 3.09×10^{11} 、 3.50×10^{11} copies/μL。

1.5 CymMV 和 ORSV 实时荧光定量 PCR 检测体系的构建

1.5.1 引物设计 根据 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因克隆片段测序结果,使用 NCBI 上的 Primer - BLAST 分别设计 RT - qPCR 引物(表 2),引物由北京擎科生物科技有限公司进行合成。

表 2 CymMV 与 ORSV 实时荧光定量 PCR 检测的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度 (bp)	产物长度 (bp)
CymMV - qF	GTGGTGTGGAATCTGATGCTGG	22	114
CymMV - qR	GGAATCGACGGCATCGAAGAAG	22	
ORSV - qF	GCTCGAACAACTGTTCACACAGC	22	122
ORSV - qR	GGATCTAATATAGGATCATAGCG	23	

1.5.2 RT - qPCR 反应体系构建 采用 TaKaRa 公司的 TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 进行 RT - qPCR,反应体系为:2.0 μL 模板 cDNA,上、下游引物各 1.0 μL,12.5 μL TB Green Premix Ex Taq II,8.5 μL ddH₂O。反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;95 ℃ 10 s。熔解曲线分析温度范围为 65 ~ 95 ℃。反应在 CF - X96 荧光定量 PCR 仪上进行。

1.5.3 建立标准曲线 将 CymMV 与 ORSV 质粒标准品用 TaKaRa 的 EASY Dilution 稀释液按 10 倍梯度逐级稀释,形成终浓度为 $10^5 \sim 10^9$ copies/μL 的 5 个梯度,分别进行 RT - qPCR 反应,每个浓度梯

度设置 3 次重复,并根据结果计算得到标准曲线。

1.5.4 灵敏度检测 按 10 倍梯度对 CymMV 与 ORSV 质粒标准品进行稀释,终浓度分别为 $3.09 \times 10^0 \sim 3.09 \times 10^9$ copies/μL 和 $3.50 \times 10^0 \sim 3.50 \times 10^9$ copies/μL,随后以稀释后各梯度质粒标准品为模板,分别对 2 种病毒进行 RT - PCR 和 RT - qPCR 检测,比较 2 种方法的灵敏度。RT - PCR 检测所用的引物和反应体系参照“1.3”节中 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因片段克隆方法。

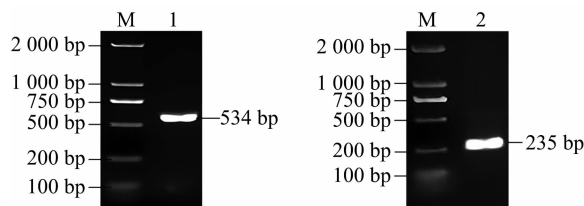
1.6 温室样品检测

对种植于云南省农业科学院花卉研究所九溪基地的 LL29、初恋、大辣椒和蓝宝石等 4 个蝴蝶兰品种,每个品种 5 株,共 20 份样品,分别提取叶片总 RNA,采用 RT - PCR 和 RT - qPCR 体系进行 CymMV 和 ORSV 病毒检测。

2 结果与分析

2.1 CymMV、ORSV 的 CP 基因片段克隆及序列分析

本研究以感染 CymMV 和 ORSV 蝴蝶兰植株的 cDNA 为模板,使用表 1 中引物分别对 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因片段进行克隆,所使用的引物特异性较好,获得了目的片段条带(图 1)。经测序获得 534 bp CymMV 的 CP 基因片段序列,以及 235 bp ORSV 的 CP 基因片段序列。



M—Marker DL 2000; 1—CymMV 的 CP 基因片段克隆;
2—ORSV 的 CP 基因片段克隆

图1 CymMV 与 ORSV 的 CP 基因克隆结果

利用 DNAMAN 软件对克隆到的 CymMV CP 基因片段序列进行分析,结果(图 2)显示,本研究 CymMV 的 CP 基因片段序列与已登录的 CymMV 的 CP 基因相应序列(GenBank:U62963.1)有 12 个核苷酸差异,1 个氨基酸差异,核苷酸相似性为 98.21%,氨基酸相似性为 99.55%,表明克隆出的目的条带正确。与其他地区分离物中 CymMV 的 CP 基因(巴西 GenBank:KX960737.1;河南 GenBank:KU873000;云南 GenBank:AM055640.2;西藏 GenBank:KP137368.1)进行比对分析,结果显

AM055640.2	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
KP137368.1	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
KU873000	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
KX960737.1	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
U62963.1	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
蝴蝶兰	MGEPTTTPAATYSAADPTSPAPKLADLAAIKYSPVTSSTAT	40
Consensus	mgepttpaatysaadptsapkladlaaikyspvtssiat	
AM055640.2	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
KP137368.1	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
KU873000	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
KX960737.1	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
U62963.1	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
蝴蝶兰	PEEIKAITQLWNNLGLPADTVGTAAIDLARAYADVGASK	80
Consensus	peeikaitqlwnnlglpadtvgtaaidlarayadvgask	
AM055640.2	SATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
KP137368.1	SATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
KU873000	SATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
KX960737.1	SATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
U62963.1	NATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
蝴蝶兰	SATLLGFCPTKGDVRRALAAGQIFVANVTPRQFCAYYAKV	120
Consensus	atllgfcptkdvrralaagqifvanvtpreqfcayyakv	
AM055640.2	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
KP137368.1	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
KU873000	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
KX960737.1	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
U62963.1	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
蝴蝶兰	VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDVAVDSTAA	160
Consensus	vwnmlatndppanwakagfqedtrfaafdfdvadvstaa	
AM055640.2	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
KP137368.1	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
KU873000	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
KX960737.1	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
U62963.1	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
蝴蝶兰	LEPAEWQRPTDRERAHHSIGKYGALARQRIQNGNLITNI	200
Consensus	lepaewqrrptdreraahsigkygalarqriqngnlitni	
AM055640.2	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
KP137368.1	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
KU873000	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
KX960737.1	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
U62963.1	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
蝴蝶兰	AEVTKGHLGSTNTLYALPAEPT	222
Consensus	aevtkghlgstntp	

图2 CymMV 的 CP 基因氨基酸序列比对

AF455274.1	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
AJ606105.1	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
KF225471.1	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
KF836079.1	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
MN027919.1	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
蝴蝶兰	MSYITIDPSKLAYLSSAWADPNSLINLCTNSLGNQFQTQQ	40
Consensus	msyitidpsklaylss wadpnslinlctnslgnqfqttq	
AF455274.1	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
AJ606105.1	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
KF225471.1	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
KF836079.1	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
MN027919.1	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
蝴蝶兰	ARTTVQQQFADVWQPVPTLTSRFPAGAGFRVYRYDEILD	80
Consensus	arttvqqqfadvwqpvpptltsrfpagag frvyry il	
AF455274.1	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
AJ606105.1	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
KF225471.1	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
KF836079.1	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
MN027919.1	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
蝴蝶兰	PLITELMGTFDTRNRIIEVNPQNPTTTETLDATRRVDDA	120
Consensus	plitelmgtfdtrnrriiev npqnptttetldatrrvdda	
AF455274.1	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
AJ606105.1	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
KF225471.1	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
KF836079.1	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
MN027919.1	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
蝴蝶兰	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTS	157
Consensus	tvairsainnllnelvrg gmynqvsfetmsgltwts	

图3 ORSV 的 CP 基因氨基酸序列比对

示,本研究 CymMV CP 基因片段序列与上述地区分离物中 CymMV CP 基因序列核苷酸相似性为 97.92% ~ 98.66%,氨基酸相似性为 95.52% ~ 99.55%,表明来自不同地区分离物中的 CymMV CP 基因序列存在保守性。

本研究克隆获得的 ORSV CP 基因片段序列与已登录的 ORSV 的 CP 基因相应序列 (GenBank: AJ606105.1) 有 7 个核苷酸差异,5 个氨基酸差异,核苷酸相似性为 98.53%,氨基酸相似性为 96.84%,表明克隆出的目的条带正确 (图 3)。与广州 (GenBank: KF836079.1)、印度 (GenBank: MN027919.1)、贵州 (GenBank: KF225471.1)、台湾 (GenBank: AF455274.1) 等其他地区分离物中的 ORSV CP 基因相应序列的核苷酸相似性为 99.12% ~ 99.56%,氨基酸相似性为 98.73% ~ 99.37%,表明来自不同地区分离物中的 ORSV CP 基因序列存在保守性。

2.2 RT-qPCR 标准曲线的建立

本研究首先对 RT-qPCR 引物特异性进行分析,结果表明,表 1 中引物用于蝴蝶兰 CymMV 和 ORSV CP 基因序列 RT-qPCR 检测时,熔解曲线为单一峰,引物特异性较好 (图 4-A、图 4-B)。

质粒标准品以 10 倍梯度逐级稀释后,CymMV

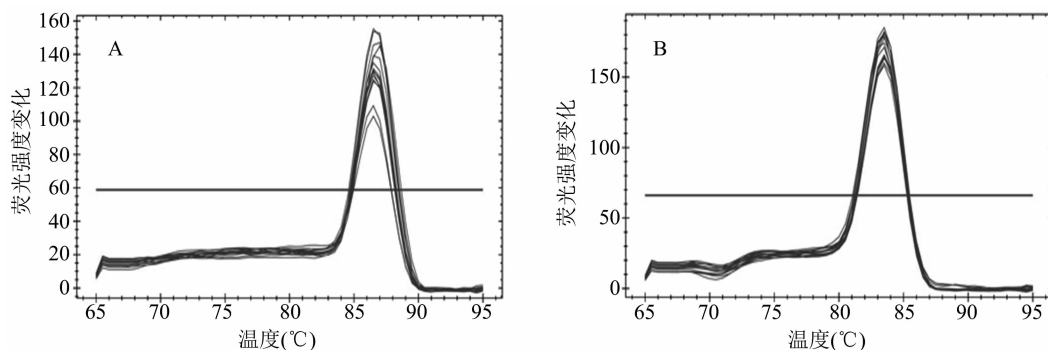


图4 CymMV 和 ORSV 的 RT-qPCR 溶解曲线

选取 $3.09 \times 10^5 \sim 3.09 \times 10^9$ copies/ μL 等 5 个浓度的质粒标准品为模板, ORSV 选取 $3.50 \times 10^5 \sim 3.50 \times 10^9$ copies/ μL 等 5 个浓度的质粒标准品为模板, 分别建立 RT-qPCR 标准曲线。结果表明, 2 种病毒质粒模板浓度的对数值与循环定量 (C_q) 值呈现良好的线性关系, CymMV 的标准曲线为 $y =$

$-3.459x + 43.98$, $r^2 = 0.999$, 扩增效率 (E) 为 94.6% (图 5-A); ORSV 的标准曲线为 $y = -3.427x + 48.42$, $r^2 = 0.9841$, 扩增效率为 95.8% (图 5-B), 其中, y 均为 C_q 值, x 为模板浓度 (C) 的对数值 ($\lg C = x$)。该标准曲线可用于后期病毒浓度的计算。

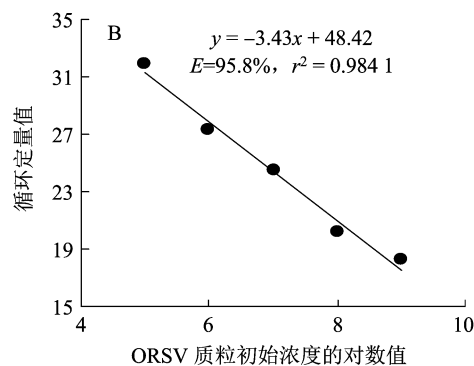
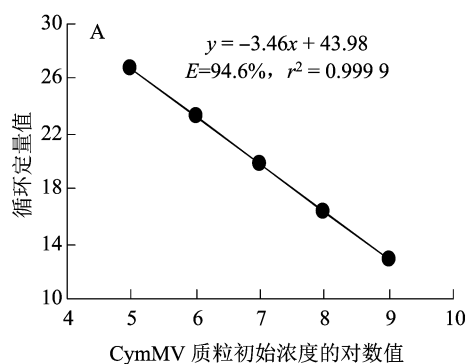
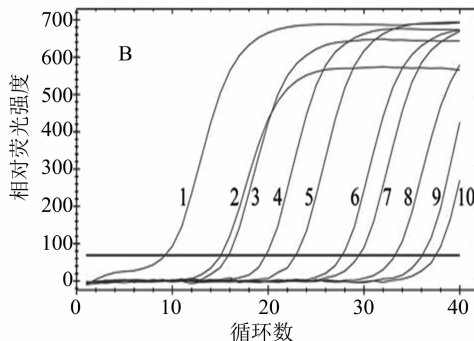
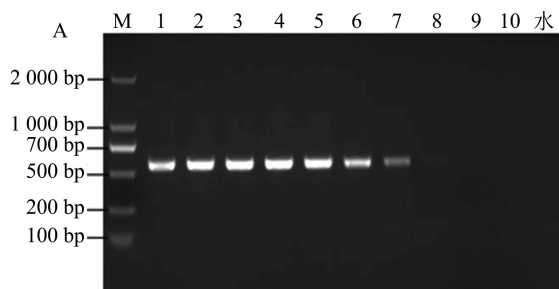


图5 CymMV 和 ORSV 的 RT-qPCR 标准曲线

2.3 RT-qPCR 和 RT-PCR 灵敏度的比较

将母液浓度为 3.09×10^{11} copies/ μL 的 CymMV 质粒标准品和 3.50×10^{11} copies/ μL 的 ORSV 质粒标准品分别按 10 倍等比稀释, 以终浓度为 $3.09 \times$

$10^0 \sim 3.09 \times 10^9$ copies/ μL 的 CymMV 质粒标准品和 $3.50 \times 10^0 \sim 3.50 \times 10^9$ copies/ μL 的 ORSV 质粒标准品为模板, 进行实时荧光定量 PCR 检测和普通 RT-PCR 检测。结果如图 6、图 7 所示, RT-PCR



M—Marker DL 2000; 1— 3.09×10^9 copies/ μL ; 2— 3.09×10^8 copies/ μL ; 3— 3.09×10^7 copies/ μL ; 4— 3.09×10^6 copies/ μL ; 5— 3.09×10^5 copies/ μL ; 6— 3.09×10^4 copies/ μL ; 7— 3.09×10^3 copies/ μL ; 8— 3.09×10^2 copies/ μL ; 9— 3.09×10^1 copies/ μL ; 10— 3.09×10^0 copies/ μL ; 水—阴性对照

图6 不同浓度 CymMV 质粒的 RT-PCR 与 RT-qPCR 灵敏度检测结果

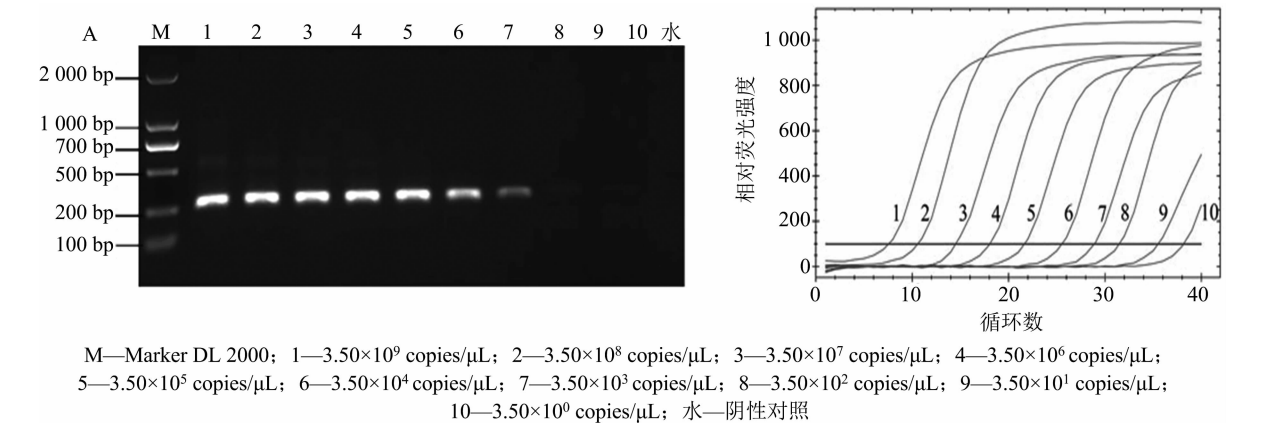


图7 不同浓度 ORSV 质粒的 RT-PCR 与 RT-qPCR 灵敏度检测结果

能检测出的 CymMV 和 ORSV 最低浓度分别为 3.09×10^2 、 3.50×10^2 copies/ μL ; RT-qPCR 能检测出的 CymMV 和 ORSV 最低浓度分别为 3.09×10 、 3.50×10 copies/ μL 。实时荧光定量 PCR 比普通 PCR 检测的灵敏度提高 10 倍。

2.4 蝴蝶兰温室栽培植株 CymMV 及 ORSV 检测

同时采用 RT-PCR 和 RT-qPCR 2 种方法对 LL29、初恋、大辣椒和蓝宝石等 4 个蝴蝶兰品种进行 CymMV 与 ORSV 检测,检测结果如表 3 所示,2

种检测方法对病毒检测的灵敏度存在差异。对 20 份样本的 RT-PCR 结果显示,15 份样品携带 CymMV,6 份样品携带 ORSV,阳性率分别为 75% 和 30%。RT-qPCR 结果则显示,20 份样品均携带 CymMV,阳性率为 100%,病毒含量在 $3.75 \times 10^1 \sim 1.47 \times 10^{11}$ copies/ μL 之间;18 份样品携带 ORSV,阳性率为 90%,病毒含量在 $9.79 \times 10^2 \sim 8.16 \times 10^8$ copies/ μL 之间,蓝宝石中有 2 株不携带 ORSV。总体上看,RT-qPCR 检测的灵敏性更高。

表 3 采用 RT-PCR 和 RT-qPCR 对温室栽培蝴蝶兰样品进行 CymMV 和 ORSV 检测的结果

样品	CymMV			ORSV		
	C_q 值	病毒含量(copies/ μL)	RT-PCR 检测结果	C_q 值	病毒含量(copies/ μL)	RT-PCR 检测结果
LL29-1	9.4	9.91×10^9	+	35.82	4.75×10^3	-
LL29-2	29.31	1.74×10^4	+	34.97	8.41×10^3	-
LL29-3	27.64	5.28×10^4	+	33.99	1.62×10^4	-
LL29-4	22.21	1.96×10^6	+	32.27	5.16×10^4	+
LL29-5	23.97	6.08×10^5	+	34.18	1.43×10^4	-
初恋 1	6.55	6.61×10^{10}	+	18.02	7.43×10^8	+
初恋 2	6.77	5.71×10^{10}	+	20.2	1.72×10^8	+
初恋 3	8.61	1.68×10^{10}	+	17.88	8.16×10^8	+
初恋 4	5.79	1.10×10^{11}	+	19.47	2.80×10^8	+
初恋 5	5.35	1.47×10^{11}	+	18.11	6.99×10^8	+
大辣椒 1	33.88	8.29×10^2	+	34.94	8.58×10^3	-
大辣椒 2	33.75	9.04×10^2	+	35.07	7.86×10^3	-
大辣椒 3	34.14	6.98×10^2	+	35.48	5.97×10^3	-
大辣椒 4	34.40	5.87×10^2	+	34.77	9.62×10^3	-
大辣椒 5	38.05	5.17×10^1	-	38.17	9.79×10^2	-
蓝宝石 1	36.60	1.36×10^2	-	N/A		-
蓝宝石 2	38.53	3.75×10^1	-	38.06	1.05×10^3	-
蓝宝石 3	37.59	7.02×10^1	-	37.73	1.32×10^3	-
蓝宝石 4	36.62	1.34×10^2	-	37.29	1.77×10^3	-
蓝宝石 5	34.25	6.48×10^2	+	N/A		-

注:“+”表示 RT-PCR 检测结果为阳性;“-”表示 RT-PCR 检测结果为阴性;N/A 表示未检测到病毒。

尽管温室栽培的蝴蝶兰样品普遍携带 CymMV 与 ORSV,但是从病毒拷贝数来看,不同的品种携带病毒的情况不同,大辣椒和蓝宝石携带 CymMV 与 ORSV 的情况较轻,而初恋携带病毒的情况较为严重,且 CymMV 和 ORSV 复合感染的情况较为严重。

3 讨论与结论

本研究从蝴蝶兰感病植株中克隆得到 CymMV 和 ORSV 的 CP 基因片段。测序后将所得 CymMV CP 基因序列与其他地区 CymMV 分离物 CP 基因序列进行比对,得到核苷酸序列与氨基酸序列相似性分别为 97.92% ~ 98.66% 和 95.52% ~ 99.55%。与此相似,CymMV 广东分离物与 30 个其他地区的 CymMV 分离物比对,核苷酸序列与氨基酸序列相似性分别为 89.73% ~ 98.66% 和 97.31% ~ 100.00%^[22]。Rao 等通过多序列比较,发现 89 个 CymMV CP 序列核苷酸与氨基酸相似性分别为 84.6% ~ 100.00% 和 89.5% ~ 100.00%^[23],本研究结果与之相似。本研究中 ORSV CP 基因片段测序后与其他地区 ORSV 分离物序列进行对比,得到核苷酸序列与氨基酸序列相似性分别为 99.12% ~ 99.56% 和 98.73% ~ 99.37%。与此相似,ORSV 广东分离物与 37 个其他地区的 ORSV 分离物比对,核苷酸序列与氨基酸序列相似性分别为 96.65% ~ 100.00% 和 93.67% ~ 100.00%^[22]。吴伟文等所得 ORSV 江苏分离物与 141 个其他地区 ORSV 分离物 CP 基因核苷酸序列相似性在 94% 以上^[24],本研究结果与之相似。由此可见,CymMV 和 ORSV 的 CP 基因核苷酸序列及编码蛋白氨基酸序列在来自不同地区的分离物间存在保守性,这 2 种病毒的 CP 基因片段可作为模板,构建稳定的病毒检测体系,用于检测不同地区的蝴蝶兰植株。

灵敏度是影响病毒早期诊断的关键因素^[25]。本研究构建的 RT-qPCR 检测体系能检测出 CymMV 和 ORSV 的最低浓度分别为 3.09×10^3 、 3.50×10^3 copies/ μL 。与此相似,漂芳等在使用 RT-qPCR 对河南蝴蝶兰的检测中,可检测出 CymMV 最低浓度为 2.66×10^3 copies/ μL ^[26]。宋蒙等在百合中使用 RT-qPCR 检测车前草花叶病毒 (*Plantago asiatica* mosaic virus, 简称 PLAMV),可检出最低浓度为 1.3×10^3 copies/ μL ^[27],本研究结果与之类似,检测下限均处于 10^3 copies/ μL 数量级。然而,Eun 等以 Taq Man 探针为检测体系中的荧光

指示剂,使用 RT-qPCR 对兰科植物中 CymMV 和 ORSV 进行检测,可检测出 CymMV 和 ORSV 最低为 10^4 copies^[28],本研究结果与之存在差异,这可能是检测体系中所用荧光指示剂不同导致的。在本研究中,RT-qPCR 对 CymMV 和 ORSV 检测的灵敏性较 RT-PCR 提高 10 倍,这与使用 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测西瓜种子中黄瓜绿斑驳花叶病毒 (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) 的灵敏度比较结果^[14]相同。然而,使用 RT-qPCR 对百合中 PLAMV 检测灵敏度较 RT-PCR 高 100 倍^[27],灵敏性略高于本研究,这可能是因为本研究的 RT-PCR 扩增效率较高。

CymMV 和 ORSV 是兰科植物病毒中危害最严重的 2 种病毒,且二者经常复合侵染兰科植物^[29-30]。本研究对 20 份云南地区温室栽培的蝴蝶兰样品进行检测,CymMV 阳性率为 100%,ORSV 阳性率为 90%,2 种病毒复合感染阳性率为 90%,蝴蝶兰携带病毒较多,复合感染的情况较为普遍。与此相似,柳爱春等采用酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 检测法对浙江地区蝴蝶兰进行检测,CymMV 阳性率为 70%,ORSV 病毒阳性率为 60%,2 种病毒复合感染率为 56.7%,表明这 2 种病毒对浙江省蝴蝶兰侵染率较高^[31]。与本研究不同,谢林娜等采用 ELISA 检测法对来自广东、江苏省大型蝴蝶兰生产基地的 45 个蝴蝶兰样品进行检测发现 CymMV 阳性率为 20.0%,ORSV 病毒阳性率为 71.1%,2 种病毒复合感染阳性率为 17.8%^[32]。周国辉等采用双重 RT-PCR 对广东顺德 153 份兰花样品进行检测,CymMV 阳性率为 49.7%,ORSV 病毒阳性率为 34.0%,2 种病毒复合感染率为 1.3%^[33]。本研究结果与上述研究存在差异,这可能与不同地区蝴蝶兰品种和栽培环境差异以及检测方法灵敏度不同有关。

综上所述,蝴蝶兰受 CymMV 和 ORSV 危害较为普遍,未来需进一步开展种苗脱毒技术研究以此推动蝴蝶兰产业健康发展。

参考文献:

- [1] 梁芳,邓祖丽颖,许申平,等. 蝴蝶兰 2 种病毒的同时检测及其 CP 融合反义表达载体构建[J]. 西南农业学报,2018,31(8): 1622-1627.
- [2] Chien K W, Agrawal D C, Tsay H S, et al. Elimination of mixed 'Odontoglossum ringspot' and 'Cymbidium mosaic' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm -

- like body selection[J]. Crop Protection, 2015, 67: 1–6.
- [3] Pai H, Jean W H, Lee Y S, et al. Genome – wide analysis of small RNAs from *Odontoglossum* ringspot virus and *Cymbidium* mosaic virus synergistically infecting *Phalaenopsis*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(2): 188–205.
- [4] Lee C H, Zheng Y X, Jan F J. The orchid – infecting viruses found in the 21st century[M]//Orchid biotechnology III. New Jersey: World Scientific, 2017: 145–164.
- [5] Kim S M, Choi S H. Simultaneous detection of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in orchids using multiplex RT – PCR[J]. Virus Genes, 2015, 51(3): 417–422.
- [6] Kondo H, Takemoto S, Maruyama K, et al. Cymbidium chlorotic mosaic virus, a new sobemovirus isolated from a spring orchid (*Cymbidium goeringii*) in Japan[J]. Archives of Virology, 2015, 160(8): 2099–2104.
- [7] Wong S M, Mahtani P H, Lee K C, et al. Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis[J]. Archives of Virology, 1997, 142(2): 383–391.
- [8] Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana* [J]. Cell, 2000, 103(1): 157–167.
- [9] 明艳林, 郑国华. 齿兰环斑病毒的研究进展[C]//陈海如. 第三次全国植物病毒和病毒防治学术研讨会论文集. 云南昆明: 中国植物病理学会, 2003: 158–162.
- [10] Ryu K H, Park W M. Nucleotide sequence analysis of a cDNA clone encoding the 34K movement protein gene of odontoglossum ringspot virus, ORSV – Cy, the Korean isolate[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(3): 995–999.
- [11] 刘沛然, 王四清. 建兰花叶病毒及齿兰环斑病毒的检测方法[J]. 热带作物学报, 2009, 30(1): 99–103.
- [12] 涂小云, 董小艳, 郭春梅, 等. 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.
- [13] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, et al. Real – time reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT – PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. Immunology and Cell Biology, 2001, 79(3): 213–221.
- [14] 刘 美, 王毓洪, 彭 斌, 等. 黄瓜绿斑花叶病毒实时荧光定量 PCR 检测体系的建立[J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1063–1070.
- [15] 王艳娇, 崔甜甜, 黄爱军, 等. 柑橘脉突病毒实时荧光定量 RT – PCR 检测体系的建立与应用[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1613–1620.
- [16] 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.
- [17] 高艳玲, 范国权, 程胜群, 等. 苜蓿花叶病毒 RT – PCR 和 RT – qPCR 检测技术体系的建立与应用[J]. 植物保护学报, 2022, 49(2): 515–527.
- [18] Al Rwahnih M, Osman F, Sudarshana M, et al. Detection of Grapevine leafroll – associated virus 7 using real time qRT – PCR and conventional RT – PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 179(2): 383–389.
- [19] Shabrangy A, Roustan V, Reipert S, et al. Using RT – qPCR, proteomics, and microscopy to unravel the spatio – temporal expression and subcellular localization of hordoinolines across development in barley endosperm[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 775.
- [20] Elmahdy E M, Shaheen M N F, Mahmoud L H I, et al. Detection of norovirus and hepatitis a virus in strawberry and green leafy vegetables by using RT – qPCR in Egypt [J]. Food and Environmental Virology, 2022, 14(2): 178–189.
- [21] Vazquez – Iglesias I, McGreig S, Pufal H, et al. A novel high – throughput sequencing approach reveals the presence of a new virus infecting *Rosa*: rosa ilarvirus – 1 (RIV – 1) [J]. Journal of Virological Methods, 2022, 300: 114417.
- [22] 任 锐, 魏永路, 朱根发, 等. 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.
- [23] Rao X Q, Li Y, Sun J, et al. Genetic diversities of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus isolates based on the coat protein genes from orchids in Guangdong Province, China[J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163(4): 324–329.
- [24] 吴伟文, 贺 振, 刘 炯, 等. 江苏省建兰齿兰环斑病毒的鉴定和遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 745–753.
- [25] Pallás V, Más P, Sánchez – Navarro J A. Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot – blot hybridization[M]//Foster G D, Taylor S C. Plant Virology Protocols. New Jersey: Humana Press, 1998: 461–468.
- [26] 梁 芳, 张 燕, 王若斓, 等. 建兰花叶病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(3): 572–580.
- [27] 宋 蒙, 徐雷锋, 曹雨薇, 等. 百合中车前草花叶病毒的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 园艺学报, 2021, 48(12): 2497–2505.
- [28] Eun A J C, Seoh M L, Wong S M. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the *TaqMan*® real – time RT – PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 87(1/2): 151–160.
- [29] Jensen D D. Virus diseases of orchids in the Netherlands[J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1970, 76(3): 135–139.
- [30] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C, et al. Viruses of orchids and their control[J]. Plant Disease, 1990, 74(9): 621–626.
- [31] 柳爱春, 刘 超, 赵 芸, 等. 利用 ELISA 检测两种兰花病毒的研究[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(2): 91–95.
- [32] 谢林娜, 苏梦芸, 朱明明, 等. 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.
- [33] 周国辉, 陈晓琴, 李梅辉, 等. 广东地区两种兰花病毒病害的分子鉴定及检测[J]. 中国病毒学, 2004, 19(2): 149–152.