

基于免核酸提取可视化 RT-LAMP 快速检测 黄瓜绿斑驳花叶病毒

尹新颖¹, 曹际娟^{1*}, 李鑫², 杨莉莉¹, 朴永哲¹

(1. 大连民族大学, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600; 2. 大连海关技术中心, 大连 116001)

摘要 本文基于逆转录环介导恒温扩增 (RT-LAMP) 技术建立葫芦科作物中黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 免核酸提取的可视化快速检测方法。根据 CGMMV 全基因组序列, 筛选保守区域并设计特异性 RT-LAMP 检测引物。通过荧光扩增方法 (加 SYTO-9) 和可视化方法 (加钙黄绿素), 开展 RT-LAMP 特异性、灵敏度和重现性试验分析。结果表明, 优化筛选的引物组可以特异性地检测 CGMMV, 检测灵敏度达到 4.21×10^3 fg/ μ L, 组内和组间变异系数均小于 5%, 重现性好。对瓜类作物田间种苗、植株叶片及市售种子等 103 份样品进行检测及一致性分析, 表明该方法与基于 RNA 提取 RT-LAMP、荧光 RT-qPCR 及免疫测试条检测结果之间的 Kappa 值均为 1.0 (1~1, 95% 置信区间), 具有很好的一致性。基于免核酸提取的可视化 RT-LAMP 快检方法成为适合现场快速检测的理想选择, 对于 CGMMV 危害葫芦科作物的田间监测以及疫情防控具有广泛的推广应用前景。

关键词 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 逆转录环介导恒温扩增 (RT-LAMP); 可视化; 免核酸提取

中图分类号: S 436.421 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021663

Rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus based on visual RT-LAMP without nucleic acid extraction

YIN Xinying¹, CAO Jijuan^{1*}, LI Xin², YANG Lili¹, PIAO Yongzhe¹

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Dalian Customs District, Dalian 116001, China)

Abstract To realize the rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), a visual detection method of CGMMV in Cucurbitaceae crops was established based on RT-LAMP without nucleic acid extraction. According to the complete genome sequence of CGMMV, the conserved regions were screened and specific RT-LAMP detection primers were designed. Specificity, sensitivity and repeatability were analyzed by RT-LAMP fluorescence amplification (SYTO-9) and visual RT-LAMP method (calcein). Results showed that the optimized primers for this method can detect CGMMV specifically, and the detection sensitivity is 4.21×10^3 fg/ μ L total RNA. The coefficient of variation (CV) within and between groups were less 5%, with good repeatability. The 103 samples of field seedlings, plant leaves and commercial seeds of melon crops were monitored, detected and analyzed. The results showed that the Kappa value between this method and RT-LAMP based on RNA extraction, fluorescent RT-qPCR and immunoassay strip were 1.0 (1–1, 95% confidence interval), and indicated an excellent test agreement. The visual RT-LAMP method has become an ideal choice for field rapid detection. It has a wide application prospect for field monitoring, preventing and controlling the epidemic of CGMMV.

Key words cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV); RT-LAMP; visualization; free nucleic acid extraction

黄瓜绿斑驳花叶病毒病是一种毁灭性的植物病害^[1], 主要危害黄瓜、西葫芦、西瓜和甜瓜等葫芦科

作物, 导致叶片斑驳、果实变形和植株发育迟缓, 产量显著下降^[2], 严重威胁着葫芦科作物的生产^[3]。

收稿日期: 2021-11-26 修订日期: 2022-02-22

基金项目: 大连市高层次人才创新支持计划 (2019CT09)

* 通信作者 E-mail: caojijuan@dlmu.edu.cn

1935 年,英国 Ainsworth^[4] 首次报道黄瓜绿斑驳花叶病毒 (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) 在黄瓜上的危害,此后,该病毒陆续传播到加拿大^[5]、美国^[6]、波兰^[7]、西班牙^[8]、印度^[9]、巴基斯坦^[10]、日本^[11]、韩国^[12]、缅甸^[13] 等 20 多个国家和地区。2003 年我国首次在广西观赏南瓜上发现该病毒^[14],之后又陆续在广东、湖南、江苏、海南、辽宁等地发现疫情^[15-16]。该病毒已被许多国家和地区列为重点关注的检疫性有害生物。CGMMV 的主要传播途径是机械传播,以及植物花粉及种子传播^[17-18]。葫芦科作物是世界上最重要的食用植物之一,也是最重要的园艺植物之一^[19],更是农民增收的重要作物^[20]。从 CGMMV 传播状况来看,实施作物田间监测,极早发现、及时阻断感染源,对于葫芦科作物的健康培育极其重要。

基于聚合酶链式反应 (PCR) 的诊断方法已广泛应用于 CGMMV 检测,具有较高的灵敏度和特异性^[21-22]。Chen 等^[23] 报道的 TaqMan 实时荧光 RT-qPCR 方法检测 CGMMV,已成为 CGMMV 检疫鉴定方法的国家标准^[24]。实时荧光 RT-qPCR 需要专业化的设备,不适合在资源有限的实验室及现场应用。Shang 等^[25] 和 Torre 等^[26] 报道免疫血清学方法包括抗原包被酶联免疫吸附试验 (ACP-ELISA)、免疫捕获逆转录聚合酶链式反应 (IC-RT-PCR)、双抗夹心酶联免疫吸附测定 (DAS-ELISA) 等可以检测 CGMMV,然而,免疫血清学方法依赖于抗体制备或商业化免疫测试盒,检测成本高,并且研究表明 RT-qPCR 检测灵敏度比免疫测定高 10 000 倍^[26]。近几年,不需要复杂仪器设备的恒温扩增技术发展迅速,已被广泛用于各种植物病原体的检测^[27-28]。Li 等^[29] 报道 RT-LAMP 方法可快速检测 CGMMV,但需要核酸提取以及用于荧光扩增曲线观察的实时荧光分析仪。CGMMV 侵染植物造成的病情呈逐年加重趋势,目前尚缺乏简单、可靠和灵敏度高的适合现场快速检测的有效方法,对作物开展田间监测仍然面临巨大挑战。

本文基于 RT-LAMP 技术,以 CGMMV 的移动蛋白基因保守区为靶标,设计筛选 5 组引物,利用钙黄绿素为荧光显色指示剂,建立了一种免核酸提取的可视化 RT-LAMP 快速检测方法,无需昂贵的仪器设备,使用简便的恒温器,便可在 30 min 内实现肉眼可见的精准检测,具有广泛的田间监测推广应

用前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试材

CGMMV 阳性西瓜叶片样品、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 阳性烟草叶片样品、甜瓜黄斑病毒 (melon yellow spot virus, MYSV) 阳性西瓜叶片样品由厦门海关技术中心提供;小西葫芦黄花叶病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 阳性叶片样品 (C2300) 购于 Agdia (美国) 公司。实际测试样品,包括收集于辽宁省营口市某西瓜种苗基地、大连市金普新区某企业出口葫芦科植物制种基地的田间西瓜幼苗疑似感病样品 35 份、黄瓜幼苗及植株叶片监测样品 40 份,以及在辽宁地区收集和采购的黄瓜种子样品 3 份、西葫芦种子样品 25 份。

1.1.2 主要试剂与仪器

基因组 RNA 提取试剂 (Code No. 9766),裂解试剂 (Code No. 9182),宝生物工程 (大连) 有限公司;RNA 恒温扩增试剂和 SYTO-9 荧光染料,广州双螺旋基因技术有限公司;荧光目视检测试剂 (钙黄绿素,SLP221),荣研生物科技 (中国) 有限公司;超微量分光光度计 (Micro Drop),上海宝予德科学仪器有限公司;实时荧光 PCR 仪 (CFX96),BIO-DL 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及基因组 RNA 提取

取待测植物组织在研钵中加入液氮进行研磨。取研磨后的试材 10 mg 加入 100 μ L 的裂解液中,振荡混合,95℃煮沸 10 min;12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,直接用于 RT-LAMP 反应。同时,采用植物基因组 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA,与直接煮沸裂解方法进行比较,以评价免核酸提取直接用于 RT-LAMP 的效果。采用超微量分光光度计测定直接煮沸裂解所获得的上清液和试剂盒提取的基因组 RNA 的吸收值,并计算 A_{260}/A_{280} 比值的核酸纯度和浓度。

1.2.2 引物设计

选取 GenBank 上公布的 22 个 CGMMV 分离物基因信息 (表 1),使用软件 DNASTar 对 22 个 CGMMV 分离物进行 CGMMV 全基因组靶序列

相似性比对分析,筛选高度保守的基因序列用来设计引物。采用 LAMP Primer Explorer 5 软件设计 5 组引物(表 2),每组有 5~6 条引物,包括 2 个外引物(OF 和 OB)、2 个内引物(IF 和 IB)和 1 个或 2 个环引物(LB 和/或 LF),并使用 Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)进行评估。引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 选取 GenBank 中 22 个 CGMMV 分离物信息表
Table 1 The 22 isolates of CGMMV information selected from GenBank

序号 No.	分离物名称 Isolate	Genbank 登录号 GenBank accession no.	来源 Source location	采集年份 Collection year
1	GDLZ	MK933286.1	中国广东	2018
2	NT	MH427279.1	澳大利亚	2014
3	CG038	MH271443.1	中国	2017
4	CG036	MH271441.1	加拿大	2016
5	CG030	MH271435.1	希腊	2000
6	CG029	MH271434.1	希腊	2000
7	CG027	MH271432.1	法国	2014
8	CG017	MH271422.1	泰国	2016
9	CG015	MH271421.1	荷兰	2016
10	CG013	MH271419.1	荷兰	2016
11	CG006	MH271412.1	以色列	2015
12	CG004	MH271410.1	美国	2014
13	ON7	MF510469.1	加拿大	2009
14	ON6	MF510468.1	加拿大	2009
15	ON4	MF510466.1	加拿大	2009
16	ON3	MF510465.1	加拿大	2009
17	pXT1	KY753929.1	中国河南	2011
18	eWT	KY753928.1	中国河南	2011
19	C284R	KY753927.1	中国河南	2011
20	JN	KR232571.1	中国	2015
21	W	V01551.1	不详	2015
22	DY13	KM873789.1	中国浙江	2013

表 2 本研究设计的 RT-LAMP 检测 CGMMV 引物序列信息
Table 2 Sequence of RT-LAMP primers for CGMMV in this study

分组 Group	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	位置(nt) Position
第 1 组 Group 1	CGMMV-OF1	TGTCAAGTTGTTGCGTGG	5 158—5 175
	CGMMV-OB1	AACAGAGAATTCGCGGAC	5 359—5 342
	CGMMV-IF1	ACGTTCCATACACCAGAAACCAGATCTTACAAAACACCTTTATGTCA	5 155—5 204
	CGMMV-IB1	TAGGGGTGGTGCTACTGTTGGAAAAATTTGCATATAGTTCCTCT	5 348—5 305
	CGMMV-LB1	GCCAGATCGCGATTTCAC	5 951—5 969
第 2 组 Group 2	CGMMV-OF2	CTTATTTCCATTTACTCGACGAT	4 868—4 890
	CGMMV-OB2	GAGCAACTTATCGACCCA	5 074—5 057
	CGMMV-IF2	GGCGCTTATCACTCAAATACTTACAGCAATCCACGAATTATTTCT	4 864—4 911
	CGMMV-IB2	AGATGTCTCTAAGTAAGGTGTCAGTAGAGATTTTGACAACTTCTCAG	5 085—5 034
	CGMMV-LF2	ACTGCAACCCCAAGCATT	4 929—4 912
第 3 组 Group 3	CGMMV-OF3	AGTATCCTGATATACAGGCTAC	4 628—4 649
	CGMMV-OB3	AACTCCTCAACATGCTCAT	4 823—4 805
	CGMMV-IF3	TTCCCGCAGAAGTAACCATACTTCTGCCAACCTTGTTTGAA	4 624—4 667
	CGMMV-IB3	ACCATGCCAACGGCTGTATTCCCTACAAGACTCTTATTACCT	4 823—4 782
	CGMMV-LF3	TCGGAAAAGTTTCGCCTCAAAA	4 689—4 668

续表 2 Table 2(Continued)

分组 Group	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	位置(nt) Position
第 4 组 Group 4	CGMMV-OF4	GCCAACCTTGTTTGAATT	4 651—4 669
	CGMMV-OB4	TCGAGTAAATGGAAATAAGCAC	4 886—4 865
	CGMMV-IF4	CCGTTGGCATGGTGAATTATATACTGAGGCGAACTTTTCCGA	4 646—4 689
	CGMMV-IB4	TAAGAGTCTTGTAGGGTATGAGCATATGAGCAACGTCGAGGA	5 384—5 343
	CGMMV-LF4	CCGAGAAGTAACCATACTTCTT	4 712—4 690
第 5 组 Group 5	CGMMV-OF5	ATTCACCATGCCAACGG	4 723—4 739
	CGMMV-OB5	GCATCCTTGTGTCAACCA	5 294—5 277
	CGMMV-IF5	CGTGGATTGCATCGTCGAGTAAGTATGAGCATGTTGAGGAGTT	4 774—4 823
	CGMMV-IB5	CCTCGTGCCTGTCAAGTTGTGGTACGTTCCATACACCAG	5 264—5 226
	CGMMV-LF5	GAGCAACGTCGAGGAGAG	4 849—4 832
	CGMMV-LB5	TGCGTGGTGTTGATCTTACA	5 169—5 188

1.2.3 RT-LAMP 反应

RT-LAMP 反应体系为 2×RM 反应液12.5 μL, Bst DNA 聚合酶 1.0 μL, AMV 酶0.2 μL, SYTO-9 荧光染料 0.5 μL (或可视化的钙黄绿素 1.0 μL), 引物 1.0 μL (内引物终浓度 0.4~1.6 μmol/L, 外引物终浓度 0.1~0.2 μmol/L, 环引物终浓度 0.1~0.8 μmol/L), 裂解上清液或提取的植物基因组 RNA 2 μL, 超纯水补齐至总体积 25 μL。

通过实时荧光 PCR 仪或者 LAMP 实时浊度仪观察荧光扩增曲线 (加 SYTO-9): 将上述 25 μL 反应液管置于仪器中, 设置反应条件为 63℃ 1 min 作为 1 个循环, 于 63℃ 1 min 处收集荧光信号, 45 个循环, 反应结束后分析荧光扩增曲线结果。

通过可视化观察扩增产物的颜色变化 (加钙黄绿素): 将上述 25 μL 反应液管置于恒温加热器 63℃ 保温 30 min, 95℃ 2 min (或者冰上 10 min) 终止反应, 然后在紫外光下 (波长 350~370 nm) 观察呈现浑浊绿色荧光为阳性结果, 无浑浊则为阴性结果。

1.2.4 特异性分析

为评价本研究所建立的可视化 RT-LAMP 检测 CGMMV 的特异性, 使用黄瓜花叶病毒 (CMV)、甜瓜黄斑病毒 (MYSV)、小西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV) 基因组 RNA 进行评估。采用健康番茄种子作为阴性对照, 超纯水作为空白对照。

1.2.5 灵敏度分析

使用超微量分光光度计测定 CGMMV 阳性叶片样品免核酸提取的裂解上清液浓度, 将阳性叶片

样品提取液分别按照 10 倍稀释成以下系列浓度: 4.21×10⁷、4.21×10⁶、4.21×10⁵、4.21×10⁴、4.21×10³、4.21×10²、4.21×10¹、4.21×10⁰ fg/μL。每个浓度至少重复 3 次, 使用超纯水和健康植物总 RNA 作为阴性对照, 按照 RT-LAMP 反应检测过程, 确定本方法的灵敏度。

1.2.6 重现性分析

分别取等量的 3 份 CGMMV 阳性叶片样品, 采用同一批次裂解试剂和同一批次 RNA 恒温扩增试剂进行免核酸提取的荧光 RT-LAMP 试验, 记录 Ct 值, 计算标准偏差 (SD) 和组内变异系数 (CV)。另取等量的 3 份 CGMMV 阳性叶片样品, 采用 3 组不同批次的裂解试剂和 RNA 恒温扩增试剂进行同样的试验, 记录 Ct 值, 计算标准偏差 (SD) 和组间变异系数 (CV)。每组测试至少重复 3 次。

1.2.7 实际样品中的检测应用

为了评估免核酸提取 RT-LAMP 分析在实际样品检测中的适用性, 本研究在 2019 年 5 月到 2020 年 10 月期间在辽宁地区收集了 103 份样品, 包括田间西瓜幼苗疑似感病样品 35 份、黄瓜幼苗及植株叶片监测样品 40 份, 以及收集和采购黄瓜种子样品 3 份、西葫芦种子样品 25 份。采用基于免核酸提取的可视化 RT-LAMP 方法进行检测, 同时采用基于 RNA 提取的 RT-LAMP、GB/T 28071-2011 标准中荧光 RT-qPCR 方法^[24]、免疫试纸条^[24]进行比对验证。使用 IBM SPSS Statistics 分析软件对检测结果进行一致性检验 (Kappa 系数) 来分析本研究建立的基于免核酸提取 RT-LAMP 方法与上述其他方法的检测结果之间的一致程度。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 引物的优化筛选结果

通过 RT-LAMP 荧光扩增曲线分析 (加 SYTO-9),本研究设计的 5 组 CGMMV 检测引物 (表 2) 的筛选结果表明,第 1、2、3、4、5 组引物检测 CGMMV 阳性样品分别在 47、26、20、8 min 和 16 min 时出现扩增曲线。前 4 组阴性对照均无扩增曲线,但第 5 组在反应 31 min 时阴性对照出现扩增曲线。由此可见,本研究所设计的第 4 组引物检测 CGMMV 的所需时间最短,扩增效率最高。因此,选择第 4 组引物用于后续试验。

2.2 植物组织免核酸提取液的测定分析及比较结果

2.2.1 免核酸提取液的纯度测定及比较结果

选取感染 CGMMV 的西瓜叶片样品,分别采用免核酸提取处理样品及试剂盒提取基因组 RNA,经超微量分光光度计测定吸光度值并计算浓度。采取直接煮沸裂解方法获取的上清液的 A_{260}/A_{280} 为 1.91 ± 0.05 ,采取试剂盒提取基因组 RNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.47 ± 0.05 ,2 种方法所获得的基因组提取液均能满足正常的核酸检测需求。

2.2.2 免核酸提取液的 RT-LAMP 分析及比较结果

通过 RT-LAMP 荧光扩增曲线 (加 SYTO-9) 和紫外光下观察产物颜色浊度变化 (加钙黄绿素) 来分析 1.2.1 节所述 2 种方法所获得的基因组提取液的检测效果。RT-LAMP 荧光扩增 (加 SYTO-9) 曲线分析结果如图 1 所示,通过紫外光下观察产物颜色浊度变化 (加钙黄绿素) 结果如图 2 所示。由

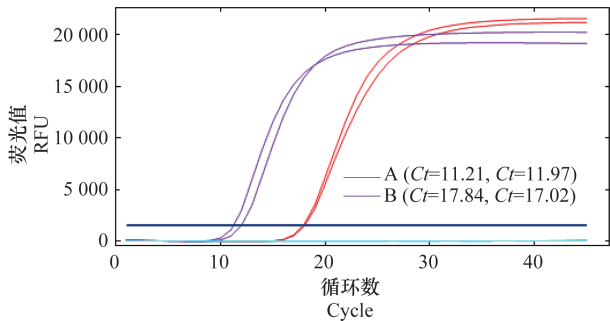


图 1 免核酸提取法(A)和试剂盒法(B)的 RT-LAMP 荧光扩增曲线结果

Fig. 1 The results of RT-LAMP fluorescence amplification curve for nucleic acid free extraction(A) and kit(B)

图 1 和图 2 结果可见,采用 2 种不同方法的基因组提取液,经 RT-LAMP 扩增均能检出典型的阳性荧光扩增曲线 (图 1);通过紫外光下观察产物颜色浊度变化 (加钙黄绿素),也均可以产生典型的浑浊绿色荧光的阳性结果 (图 2)。综合分析,免核酸提取方法可以达到与商业化试剂盒提取基因组的同等检测效果,能够满足可视化 RT-LAMP 检测植物组织中的 CGMMV。

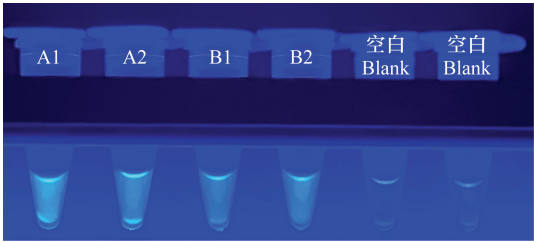


图 2 免核酸提取法(A)和试剂盒法(B)的紫外光下可视化 RT-LAMP 检测结果

Fig. 2 The results of visual RT-LAMP detection for nucleic acid free extraction(A) and kit(B) under UV light

2.3 特异性检测结果

采用优化筛选后的 RT-LAMP 引物 (第 4 组引物) 进行特异性试验,对 CGMMV、黄瓜花叶病毒 (CMV)、甜瓜黄斑病毒 (MYSV)、小西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV) 的基因组 RNA 进行 RT-LAMP 分析,分别通过荧光扩增曲线 (加 SYTO-9) 和紫外光下观察扩增产物的颜色变化 (加钙黄绿素),分析检测特异性。由图 3 可见,经 RT-LAMP 检测 (加 SYTO-9),仅 CGMMV 检出典型阳性的荧光扩增曲线,其他样品均为阴性。由图 4 可见,经 RT-LAMP 检测 (加钙黄绿素),紫外光下扩增产物的颜色浊度变化,仅观察到 CGMMV 呈现出阳性的浑浊荧光结果,其他样品均为阴性。可见,本研究设计的第 4 组

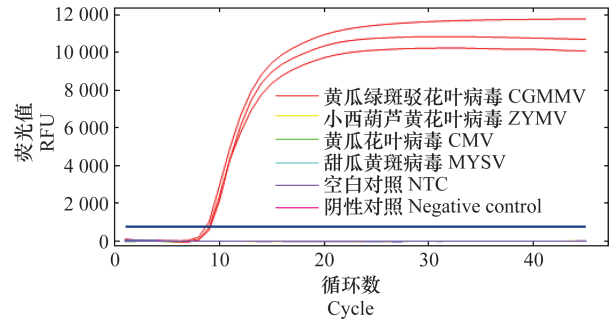


图 3 RT-LAMP 检测 CGMMV 的特异性荧光扩增曲线结果

Fig. 3 The specificity test results of RT-LAMP fluorescence amplification method for the detection of CGMMV

CGMMV 引物具有良好的特异性,可以特异性检测植物组织中感染的 CGMMV。

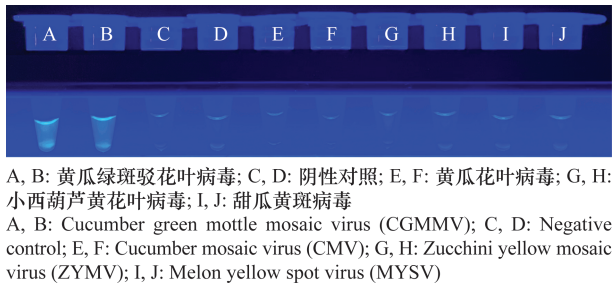


图 4 紫外光下可视化观察 CGMMV 的特异性检测结果

Fig. 4 The specificity results of visual RT-LAMP method for the detection of CGMMV under UV light

2.4 灵敏度检测结果

取 CGMMV 免核酸提取液 8 个不同浓度的 10 倍稀释液作为模板,进行 RT-LAMP 检测,分别通过荧光扩增曲线(加 SYTO-9)和紫外光下观察扩增产物的颜色变化(加钙黄绿素),分析检测灵敏度,结果如图 5 和图 6 所示。由图 5a 可见,当 CGMMV 免核酸提取液浓度在 4.21×10^3 fg/ μ L 及

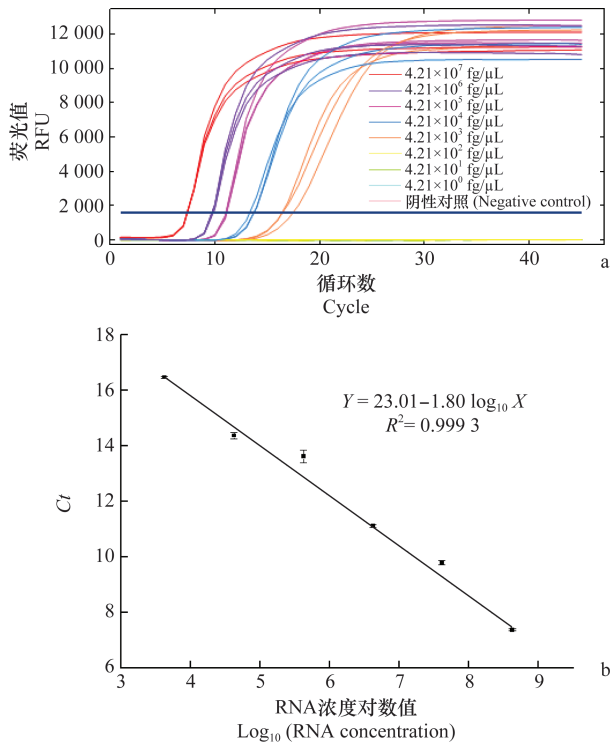


图 5 RT-LAMP 检测 CGMMV 的灵敏度荧光扩增曲线结果 (a) 及线性分析图 (b)

Fig. 5 The sensitivity results of RT-LAMP fluorescence amplification curve (a) for detection of CGMMV and linear analysis (b)

以上时,均出现典型的阳性荧光扩增曲线,经线性曲线分析(图 5b),拟合度 $R^2 = 0.9993$,线性关系良好。由图 6 可见,在紫外光下也观察到上述相同浓度的 CGMMV 免核酸提取液呈现典型的阳性浑浊绿色荧光,结果非常稳定。综上结果,本研究建立的基于免核酸提取可视化 RT-LAMP 方法检测植物中 CGMMV 灵敏度达到 4.21×10^3 fg/ μ L。

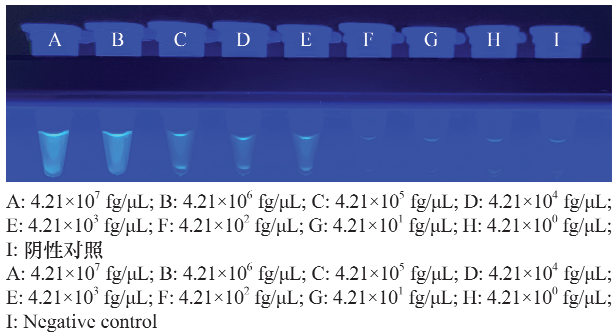


图 6 紫外光下可视化 RT-LAMP 检测 CGMMV 的灵敏度结果

Fig. 6 The sensitivity results of visual RT-LAMP for the detection of CGMMV under UV light

2.5 重现性分析

重现性试验进行组内和组间变异试验分析结果如表 3 所示。组内变异试验结果显示,RT-LAMP 荧光扩增曲线(加 SYTO-9)检测 CGMMV 的变异系数在 0.32%~2.51%之间;组间变异试验结果显示,该方法的变异系数在 1.08%~2.69%之间。由此可见,无论组内还是组间,变异系数均小于 5%,表明本研究所建立的方法具有很好的重现性和稳定性。

表 3 RT-LAMP 检测 CGMMV 的重现性试验结果¹⁾

Table 3 The reproducibility results of RT-LAMP for the detection of CGMMV

组别 Group	Ct	变异系数/ % CV
组内 Intra-group	7.68±0.02	0.32
	8.56±0.22	2.51
	7.37±0.03	0.44
组间 Inter-group	8.93±0.24	2.67
	9.85±0.11	1.08
	9.23±0.25	2.69

1) 表中 Ct 数据为平均值±标准差。
Ct vale in the table are mean±SD.

2.6 在实际样品中的检测应用

2019 年 5 月到 2020 年 10 月期间,收集辽宁省营口市某西瓜种苗基地、大连市金普新区某企业出

口葫芦科植物制种基地的田间西瓜幼苗疑似样品 35 份、黄瓜幼苗及植株叶片 40 份监测样品;并在辽宁地区收集和采购黄瓜种子样品 3 份、西葫芦种子样品 25 份。经检测 (表 4),采用本研究建立的基于免核酸提取的可视化 RT-LAMP 方法检出 5 份西瓜幼苗疑似样品、2 份西葫芦种子样品为 CGMMV 阳性结果,与其他方法进行验证比对,基于实际样品检测的一致性分析表明,本研究建立的方法与基于 RNA 提取的 RT-LAMP、荧光 RT-qPCR、免疫试纸

条之间的 Kappa 值均为 1.0 (1~1, 95%置信区间)。表明本研究建立的基于免核酸提取的可视化 RT-LAMP 方法在检测实际样品中的 CGMMV 时与基于核酸提取的 RT-LAMP 方法、实时荧光 RT-qPCR 方法及免疫试纸条检测方法具有良好的一致性。从对西瓜幼苗叶片样品和市售种子的检测结果发现 CGMMV 感染依然存在暴发的隐患,有新突发疫点的潜在可能性,开展瓜类作物及种苗、种子田间监测仍然非常重要。

表 4 采用 4 种方法对实际样品的 CGMMV 检测比对
Table 4 CGMMV detection results of four methods on actual samples

样品 Sample	样品数/份 Sample size	CGMMV 阳性结果数量/份 Positive sample number of CGMMV				Kappa 系数 Kappa
		基于免核酸提取的可视化 RT-LAMP 方法 Visual RT-LAMP of nucleic acid free extraction	基于 RNA 提取的 RT-LAMP 方法 RT-LAMP of RNA	实时荧光定量 RT-PCR 方法 RT-qPCR	免疫试纸条方法 Immunochromatographic strip	
黄瓜幼苗及叶片 Cucumber seedling and leaf	40	0	0	0	0	1.0 (1~1, 95%置信区间)
西瓜幼苗 Watermelon seedling	35	5	5	5	5	
黄瓜种子 Cucumber seed	3	0	0	0	0	
西葫芦种子 Zucchini seed	25	2	2	2	2	
合计 Total	103	7	7	7	7	

3 结论与讨论

古勤生等^[30]根据近几年来对于西瓜病毒病害的跟踪监测,推测几乎所有嫁接西瓜产区都存在 CGMMV 发生或暴发的隐患。建立低成本的可视化的植物中 CGMMV 快速检测方法开展田间现场检测,可以及时有效地防止 CGMMV 传播危害,具有很重要的现实意义。

本研究基于 RT-LAMP 技术,设计筛选了 CGMMV 最佳引物,摸索了植物组织免核酸提取的前处理,建立了一种基于免核酸提取的可视化快速检测植物中 CGMMV 方法,组内和组间变异系数均小于 5%,方法稳定。本方法的检测灵敏度可以达到 $4.21 \times 10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$,且不需要昂贵的荧光检测设备以及复杂的试验操作过程。经实际样品的比对验证,与采用基于 RNA 提取的 RT-LAMP 检测及 GB/T 28071 国家标准实时荧光 RT-qPCR 的检测结果相一致,可以实现对田间作物及其种子中微量 CGMMV 感染样品的现场检测,具有很好的推广应用价值。未来可以在植株、叶片、种子等不同感染基体的检测灵敏度上做进一步的深入研究,为制定合理的取样批次、制备试样批次提供理论基础,更有效

地服务于 CGMMV 防控的快速检测仍然是研究人员需要不断努力的方向。

参考文献

[1] 王付彬, 杨兰英, 马井玉. 山东省黄瓜绿斑驳花叶病毒病发生规律及防控措施[J]. 农业科技通讯, 2014(9): 275-276.

[2] SHIM C K, HAN K S, MBAE D W, et al. Isolation and characterization of watermelon isolate of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV-HY1) from watermelon plants with severe mottle mosaic symptoms [J]. The Plant Pathology Journal, 2005, 21(2): 167-171.

[3] DOMBROVSK A, TRAN-NGUYEN L T T, JONES R A C. Cucumber green mottle mosaic virus: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management [J]. Annual Review of Phytopathology, 2017, 55: 231-256.

[4] AINSWORTH G C. Mosaic diseases of the cucumber [J]. Annals of Applied Biology, 1935, 22(1): 55-67.

[5] LING K S, LI R, ZHANG W. First report of cucumber green mottle mosaic virus infecting greenhouse cucumber in Canada [J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 701.

[6] TIAN T, POSIS K, MAROONL C J, et al. First report of cucumber green mottle mosaic virus on melon in the United States [J]. Plant Disease, 2014, 98(8): 1163.

[7] BORADYNKO F N, MINICKA J, HASIOW J B. The occurrence of cucumber green mottle mosaic virus infecting green-

- house cucumber in Poland [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(7): 1336.
- [8] CRESPO O, JANSSEN D, GARCIA C, et al. Biological and molecular diversity of cucumber green mottle mosaic virus in Spain [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(6): 977–984.
- [9] NAGENDRAN K, MOHANKUMAR S, ARAVINTHARAJ R, et al. The occurrence and distribution of major viruses infecting cucurbits in Tamil Nadu State, India [J]. *Crop Protection*, 2017, 99: 10–16.
- [10] ALI A, HUSSAIN A, AHMAD M. Occurrence and molecular characterization of cucumber green mottle mosaic virus in cucurbit crops of KPK, Pakistan [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(4): 1247–1253.
- [11] SUGIYAMA M. The present status of breeding and germplasm collection for resistance to viral diseases of cucurbits in Japan [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2013, 82(3): 193–202.
- [12] KIM K H, KIM S, MYUNG L J, et al. Nucleotide sequences of two Korean isolates of cucumber green mottle mosaic virus [J]. *Molecules and Cells*, 2003, 16(3): 407–412.
- [13] KIM O K, MIZUTANI T, NATSUAKI K T, et al. First report and the genetic variability of cucumber green mottle mosaic virus occurring on bottle gourd in Myanmar [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(7/8): 572–575.
- [14] 秦碧霞, 蔡健和, 刘志明等. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. *植物检疫*, 2005, 19(4): 198–200.
- [15] LIU Yan, WANG Yan'an, WANG Xifeng, et al. Molecular characterization and distribution of cucumber green mottle mosaic virus in China [J]. *Journal of Phytopathology*, 2009, 157(7/8): 393–399.
- [16] ZHANG Yongjiang, LI Guifen, LI Mingfu. Occurrence of cucumber green mottle mosaic virus on cucurbitaceous plants in China [J]. *Plant Disease*, 2009, 93(2): 200.
- [17] 王献. 黄瓜绿斑驳花叶病毒病防控措施[J]. *农业开发与装备*, 2018(12): 192–193.
- [18] DARZI E, LACHMAN O, SMITH E, et al. Paths of cucumber green mottle mosaic virus disease spread and disinfectant-based management [J]. *Annals of Applied Biology*, 2020, 177(3): 374–384.
- [19] GRUMET R, MCCREIGHT J D, MCGREGOR C, et al. Genetic resources and vulnerabilities of major cucurbit crops [J/OL]. *Genes*, 2021, 12(8): 1222. DOI: 10.3390/genes12081222.
- [20] 蔡明. 辽宁省黄瓜绿斑驳花叶病毒发生现状、防控措施及成效[J]. *辽宁农业科学*, 2012(5): 59–61.
- [21] 阚春月, 于翠, 杨翠云等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒分子检测方法的建立与评价[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2010, 28(5): 457–461.
- [22] LOPEZ-FABUEL I, WETZEL T, BERTOLINI E, et al. Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 183(1/2): 21–24.
- [23] CHEN Hongyun, ZHAO Wenjun, GU Qingsheng, et al. Real time *TaqMan* RT-PCR assay for the detection of cucumber green mottle mosaic virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149(2): 326–329.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法: GB/T 28071-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [25] SHANG Haili, XIE Yan, ZHOU Xueping, et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of cucumber green mottle mosaic virus [J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 228–235.
- [26] TORRE C, AGUERO J, GOMEZ-AIX C, et al. Comparison of DAS-ELISA and qRT-PCR for the detection of cucurbit viruses in seeds [J]. *Annals of Applied Biology*, 2019, 176(2): 158–169.
- [27] KWON S J, CHO Y E, KIM M H, et al. A one-step reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay optimized for the direct detection of cucumber green mottle mosaic virus in cucurbit seeds [J/OL]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 60: 101775. DOI: 10.1016/j.mcp.2021.101775.
- [28] KUANG Chengping, DENG Tingchin, HUANG Hungchang, et al. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of zucchini yellow mosaic virus [J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(4): 238–244.
- [29] LI Jingyun, WEI Qiwei, LIU Yong, et al. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193(2): 583–588.
- [30] 古勤生, 彭斌, 刘珊珊, 等. 我国嫁接西瓜黄瓜绿斑驳花叶病毒的防控对策[J]. *中国蔬菜*, 2013(11): 5–7.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 263 页)

- [29] 刘伟, 郭秀珍. 吉林省大豆病虫害发生情况及防治技术[J]. *现代农业科技*, 2019(22): 76.
- [30] MALAPI-NELSON M, WEN R H, OWNLEY B H, et al. Co-infection of soybean with soybean mosaic virus and alfalfa mosaic virus results in disease synergism and alteration in accumulation level of both viruses [J]. *Plant Disease*, 2009, 93(12): 1259–1264.
- [31] ABDALLA O A, AL-SHAHWAN I M, ALSALEH M A, et al. Molecular characterization of alfalfa mosaic virus (AMV) isolates in alfalfa and other plant species in different regions in Saudi Arabia [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156(2): 603–613.
- [32] 任锐. 大豆抗大豆花叶病毒病基因的精细定位和候选基因分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.

(责任编辑: 田 喆)