



# 瓜类褪绿黄化病毒快速检测技术的引物筛选与体系优化

王克, 何艳艳, 张友军, 吴青君, 王少丽\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:**【目的】瓜类褪绿黄化病毒(cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV)是近年来发生的、由烟粉虱 *Bemisia tabaci* 半持久性传播的一种植物病毒,给瓜类作物带来严重经济损失。PCR 扩增是检测该病毒的常用技术,但目前已报道引物对靶标生物的检测存在扩增结果不稳定、重复性不够的问题。本研究旨在通过筛选多对引物并优化 PCR 条件获得适合于稳定检测的引物及扩增体系。【方法】以携带有 CCYV 的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 菌株菌液及其侵染获得的 CCYV 阳性黄瓜叶片 cDNA 为检测对象,从 14 对 PCR 引物中筛选出可用于稳定检测 CCYV 的引物,同时进行退火温度的优化;以携带有 CCYV 的根癌农杆菌侵染的阳性黄瓜叶片 cDNA 为模板,对筛选出来的 4 对引物及退火温度进行 PCR 扩增的稳定性和灵敏度检测;利用 4 对优选 PCR 引物对 13 份采自田间的烟粉虱成虫及寄主植物叶片的感毒状况进行检测和验证。【结果】从已报道的 14 对引物中筛选出 4 对引物可同时携带 CCYV 的根癌农杆菌 GV3101 菌液及其侵染的 CCYV 阳性黄瓜叶片 cDNA 进行稳定扩增,并获得最优的扩增程序。灵敏度检测结果显示,优选的 4 对引物可检测到 CCYV 的最低黄瓜叶片 cDNA 浓度为 0.25 ng/ $\mu$ L。利用优选的 4 对引物通过 PCR 对 13 份采自田间的烟粉虱成虫及其寄主植物叶片的 CCYV 检测发现,测试样本的 CCYV 阳性率为 69.23%。【结论】优选的 4 对引物及其对应的优化扩增程序可用于对携带有 CCYV 的根癌农杆菌及其侵染的植物叶片以及田间样本是否感染 CCYV 的检测。

**关键词:** 瓜类褪绿黄化病毒; 烟粉虱; 快速检测; 引物筛选; 检测灵敏度; 携毒率

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)02-0149-10

## Primer screening and amplification protocol optimization of rapid detection technique for *Cucurbit chlorotic yellows virus*

WANG Ke, HE Yan-Yan, ZHANG You-Jun, WU Qing-Jun, WANG Shao-Li\* (Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** 【Aim】Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) is an emerging plant virus, in semi-persistent manner, transmitted by the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. Induced virus disease by CCYV has caused severe economic losses to cucurbit crops. CCYV monitoring based on PCR method is a common technique for detecting this virus. However, some commonly used primers have the problems of unstable amplification results and insufficient reproducibility. This study aims to screen and obtain the more suitable primers for stable detection of CCYV under optimized conditions. 【Methods】The bacterial liquid of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 carrying CCYV and the cDNA from its infected

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0201300); 国家现代西甜瓜产业技术体系(CARS-25); 蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室和中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

作者简介: 王克, 男, 1991年10月生, 河南永城人, 硕士研究生, 研究方向资源利用与植物保护研究, E-mail: jackwangcaas@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangshaoli@caas.cn

收稿日期 Received: 2019-11-12; 接受日期 Accepted: 2020-01-07

cucumber leaves were amplified by PCR with 14 pairs of primers known currently to screen primers for stable detection of CCYV. The annealing temperatures were also optimized. Using the cDNA from cucumber leaves infected by *A. tumefaciens* carrying CCYV, the stability and sensitivity of the selected four primer pairs in PCR amplification were determined. Then, the CCYV infection of 13 samples including *B. tabaci* adults and host plant leaves collected from the field was detected and validated by the selected primers and the optimized amplification procedure. 【Results】 Four pairs of primers were screened out from the 14 known primer pairs, which could stably amplify cDNA from *A. tumefaciens* carrying CCYV and its infected cucumber leaves, and the optimized amplification procedure was obtained. Sensitivity test revealed that the minimum cDNA concentration of CCYV-infected cucumber leaves in PCR assay with the selected four pairs of primers was 0.25 ng/ $\mu$ L. Detection results of CCYV infection in 13 samples including *B. tabaci* adults and host plant leaves collected from the field by PCR with the selected four pairs of primers showed that 69.23% samples were CCYV positive. 【Conclusion】 The selected four pairs of primers and the corresponding optimized amplification procedure could be applied for accurate detection of CCYV in *A. tumefaciens* carrying CCYV, CCYV-infected plant leaves and field samples.

**Key words:** *Cucurbit chlorotic yellows virus*; *Bemisia tabaci*; rapid detection; primer screening; detection sensitivity; viruliferous rate

烟粉虱 *Bemisia tabaci* 属半翅目 (Hemiptera) 粉虱科 (Aleyrodidae), 是世界性重大农业害虫。烟粉虱是由 30 多个生物型 (隐种) 组成的复合种 (De Barro *et al.*, 2011), 其中 B 和 Q 型烟粉虱是入侵我国为害最严重的两个生物型。自入侵我国以来, 不同程度地对本地种烟粉虱有种群替代现象 (Jiu *et al.*, 2017), 且 Q 型烟粉虱在我国大部分地区取代了 B 型烟粉虱成为优势为害生物型 (Pan *et al.*, 2011)。由于 Q 型烟粉虱抗药性强、寄主适应性广泛及传播病毒能力高 (Ning *et al.*, 2015), 导致这种演替加速了烟粉虱在田间的发生和为害。

烟粉虱以成虫和若虫通过直接刺吸植物汁液、分泌蜜露诱发煤污病, 减弱植物光合作用。同时, 烟粉虱还可通过传播植物病毒病给作物造成间接为害, 带来更为严重的经济损失。目前, 烟粉虱传播的病毒种类至少 200 种 (Polston *et al.*, 2014), 而且新的经由烟粉虱传播的植物病毒仍在不断产生或逐渐被发现 (Boykin, 2014)。瓜类褪绿黄化病毒 (cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV) 是由烟粉虱以半持久性方式特异性传播的一种 RNA 植物病毒, 属于长线形病毒科 (*Closteroviridae*) 的毛形病毒属 *Crinivirus*, 由两条正义单链 RNA 组成, RNA1 编码病毒复制所需蛋白, RNA2 包含与病毒组装、侵染植物、介体传播有关的开放阅读框 (刘珊珊, 2013; Shi *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017), 其主要侵染西瓜、甜瓜、黄瓜等葫芦科作物 (刘珊珊, 2013)。

CCYV 病毒 2009 年在日本被发现 (Gyoutoku *et al.*, 2009), 后逐渐蔓延扩散到其他国家 (Wintermantel *et al.*, 2019)。在我国, CCYV 最初在浙江宁波、上海地区发现 (Gu *et al.*, 2011), 随后在河南、海南、北京、山东等其他多个省份陆续被发现并报道 (Huang *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011; 张汝楠等, 2012; 刘珊珊等, 2013; 曾蓉等, 2014; 彭斌等, 2017; 杨世安等, 2017; 干射香等, 2019), 给我 国瓜类作物健康生产带来了极大的威胁。

CCYV 侵染植物初期通常不表现症状, 因此快速检测技术的建立对于及时阻止该病毒传播及传播介体防控极为重要。目前已报道的对 CCYV 检测方法有 PCR 扩增法 (Huang *et al.*, 2010)、双抗体夹心酶联免疫吸附测定法 (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) (Kubota *et al.*, 2011) 和环介导等温扩增法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) (Wang *et al.*, 2014) 等。在不同的检测技术中, 快速、低成本、易于操作的技术为 PCR 扩增法。以往研究已报道了不同的 CCYV 检测引物及其检测方法 (Gyoutoku *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011; Hamed *et al.*, 2011; 袁媛等, 2012; Abrahamian *et al.*, 2013; 刘珊珊等, 2013; Keshavarz *et al.*, 2014; Orfanidou *et al.*, 2014; Wintermantel *et al.*, 2019), 然而在实际检测应用和试验中发现, 不同引物对及其配套检测体系的检测

结果不尽相同,检测的稳定性不强、重复性不足,部分检测体系由于检测靶标的不同或出现假阳性或假阴性的结果(黎铭等, 2008; 林亚玉等, 2012)。因此,筛选优化可用于介体昆虫烟粉虱和寄主植物的 CCYV 快速、稳定检测的引物及方法,对于该病毒的早期诊断、识别及介体烟粉虱防控具有重要理论和实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试烟粉虱及植物叶片

烟粉虱试虫为采自田间的甜瓜、黄瓜、丝瓜、番茄和茄子等作物上的烟粉虱成虫,经分子生物学技术检测其生物型(隐种)为 Q 型(褚栋等, 2005);检测叶片为叶片发黄、疑似携带 CCYV 的作物叶片。烟粉虱及植物叶片检测样本共计 13 份,采集时间和

地点等相关信息详见表 1。

### 1.2 主要试剂

用于 CCYV 侵染的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 菌株(分别带有 CCYV RNA1 和 RNA2 的重组表达载体)由河南农业大学施艳教授惠赠。EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司,PCR 扩增液  $2 \times$  Es Taq MasterMix 和 DNA 纯化试剂盒 DNA Clean-up Kit 购自江苏康为世纪生物科技有限公司,标准分子量 DL5000 Marker 购自 TakaRa 公司。其他常规试剂均为分析纯。

### 1.3 引物筛选和条件优化

基于已发表文献,选出 14 对用于检测 CCYV 的特异性扩增引物,引物序列及其文献来源等信息见表 2。检测引物委托上海生物工程公司合成。

表 1 田间烟粉虱成虫及其寄主植物叶片中 CCYV 的感染状况

Table 1 CCYV infection in *Bemisia tabaci* and the host plant leaves in the field

序号 No.	检测样本 Tested sample	采样地区 Collecting location	经纬度 Longitude and latitude	采样时间(年.月.日) Collecting date (year. month. day)	寄主植物 Host plants	栽培模式 Cultivation mode	CCYV 感染* CCYV infection
1	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	新疆和田 Hetian, Xinjiang	37°30'N, 79°38'E	2019.08.23	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	大棚 Plastic shed	是 Yes
2	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	河南武陟 Wuzhi, Henan	35°04'N, 113°05'E	2019.09.09	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	大棚 Plastic shed	是 Yes
3	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	山东寿光 Shouguang, Shandong	36°52'N, 118°52'E	2019.09.15	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	温室 Greenhouse	是 Yes
4	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	天津武清 Wuqing, Tianjin	39°25'N, 116°57'E	2019.09.01	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	温室 Greenhouse	是 Yes
5	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	陕西安康 Ankang, Shaanxi	33°03'N, E108°13'E	2019.07.20	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	大棚 Plastic shed	是 Yes
6	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	海南海口 Haikou, Hainan	19°48'N, 110°21'E	2019.05.09	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	露天 Open field	是 Yes
7	烟粉虱 <i>B. tabaci</i>	海南三亚 Sanya, Hainan	18°17'N, 109°29'E	2019.05.09	茄子 <i>Solanum melongena</i>	露天 Open field	是 Yes
8	叶片 Leaf	北京海淀 Haidian, Beijing	39°57'N, 116°19'E	2019.07.12	丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i>	露天 Open field	否 No
9	叶片 Leaf	北京昌平 Changping, Beijing	40°13'N, 116°06'E	2019.06.20	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	露天 Open field	否 No
10	叶片 Leaf	湖南长沙 Changsha, Hunan	28°12'N, 113°05'E	2019.06.15	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	大棚 Plastic shed	否 No
11	叶片 Leaf	湖南长沙 Changsha, Hunan	28°12'N, 113°05'E	2019.09.15	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	大棚 Plastic shed	是 Yes
12	叶片 Leaf	北京海淀 Haidian, Beijing	39°56'N, 116°17'E	2019.09.28	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	大棚 Plastic shed	是 Yes
13	叶片 Leaf	江西赣州 Ganzhou, Jiangxi	26°02'N, 115°12'E	2019.06.13	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	大棚 Plastic shed	否 No

\* 利用引物对 5, 8, 12 和 13(见表 2)通过 PCR 检测 CCYV 感染情况 CCYV infection detected by PCR with the primer pairs 5, 8, 12 and 13 as listed in Table 2.

表 2 引物序列及其文献来源  
Table 2 Primer sequences and the reference sources

引物对编号 Primer pair no.	引物 Primer	引物序列(5' - 3') Primer sequence	参考文献 References	扩增长度(bp) Amplicon length
1	CCYV-F	CGCAATCAATAAGGCGGCGACC	Gu <i>et al.</i> , 2011	804
	CCYV-R	ACTACAACCTCCCGGTGCCAACT		
2	CCYV-HSP-Fa	TGCGTATGTCAATGGTGTATG	Gyoutoku <i>et al.</i> , 2009	462
	CCYV-HSP-Ra	ATCCTTCGCAGTGAAAAACC		
3	CCYV-HSPs2	CGATTCTTTCCTCATGTACGATC	Abrahamian <i>et al.</i> , 2013	449
	CCYV-HSPas1	GACTCTTCGCAAATTGTGCT		
4	CCYV-CPs	ATGGAGAAGACTGACAATAAAGAA	Hamed <i>et al.</i> , 2011	760
	CCYV-CPas	TTTACTACAACCTCCCGGTG		
5	CC-RdRp-up	CCTAATATTGGAGCTTATGAGTACA	Orfanidou <i>et al.</i> , 2014	709
	CC-RdRp-do	CATACACTTTAAACACAACCCC		
6	CC-HSP-up	GAAGAGATGGGTTGGTGTAGATAAA		226
	CC-HSP-do	CACACCGATTTCATAAACATCCTTT		
7	CCYV RNA2 5305 FOR	ACGCGCGGCAGAGGAATTTGT	Wintermantel <i>et al.</i> , 2019	373
	CCYV RNA2 5677 REV	CCCGGTGCCAACTGAGACACG		
8	CCYV FULL RdRp FOR	AGCACTTATAACCTCCGAGTAGA		1 515
	CCYV FULL RdRp REV	TATGTTGACGCTGAACCTTTCG		
9	CCYV-f	AGTGATCGCAATCAATAAG	Keshavarz <i>et al.</i> , 2014	870
	CCYV-r	GTGATCACTTGACCATCTC		
10	CCYVCPF	ATGGAGAAGACTGACAAT	袁媛等, 2012	753
	CCYVCPR	TTATTTACTACAACCTGC		
11	CP-F	CGTAAAGTGATCGCAATCAAT	刘珊珊等, 2013	876
	CP-R	AGTGATCACTTGAC-CATCTCC		
12	CCYV-F	GCGACCATCATCTACAGGCA	Li <i>et al.</i> , 2016	152
	CCYV-R	CCGACTTGTTCCTTTCAGAGC		
13	Crimi-hsp70-f	GCCATAACCATTACGGGAGA	Huang <i>et al.</i> , 2010	389
	Crimi-hsp70-r	CGCAGTAAAAACCCAAACT		
14	Hsp F	TGCAACCGATGTCAGGTTGACGG	Gu <i>et al.</i> , 2011	1 947
	Hsp R	TGGATAATTGGTCACGACCTCCACT		

采用已鉴定的携带 CCYV 的根癌农杆菌菌株 GV3101 制备阳性菌液 (Shi *et al.*, 2016), 注射黄瓜子叶, 具体方法参照文献报道 (Shi *et al.*, 2016), 30 d 后黄瓜植株出现褪绿症状。对显现症状的黄瓜提取叶片总 RNA, 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行反转录, 反转录过程按试剂盒说明书中 PrimeScript RT Reagent Kit 中 20 μL 体系进行。采用 NanoDrop™ 2000c 分光光度计 (美国) 测定其浓度, 保存反转录的 cDNA 原液采用 CCYV-HSP-Fa 和 CCYV-HSP-Ra 引物 (Gyoutoku *et al.*, 2009) 进行 RCR 扩增, 扩增体系: 2 × Es Taq MasterMix 10 μL, CCYV-HSP-Fa (10 μmol/L) 1 μL, CCYV-HSP-Ra (10 μmol/L) 1 μL, cDNA 模板 1 μL。扩增条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35

个循环。扩增条带回收纯化并测序, 测序结果经比对确定是目标条带后, 将该阳性 cDNA 作为后续引物筛选的阳性植株模板。

用 PCR 鉴定的携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液及其成功侵染的黄瓜叶片的阳性 cDNA 为模板, 对备选的 14 对引物进行 PCR 筛选。使用 2 × Es Taq MasterMix 预混体系 (北京康为世纪生物科技有限公司) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2 × Es Taq MasterMix 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液或其侵染的黄瓜叶片的阳性 cDNA 模板 1 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足到总体积 20 μL。筛选标准为可以同时阳性菌液和阳性 cDNA 模板中检测出 CCYV 的引物对, 作为优选引物对。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循

环;最后 72℃ 延伸 5 min。鉴于 PCR 扩增采用的是扩增预混 Mix 体系,因此本研究重点对扩增体系中退火温度进行梯度 PCR 扩增的优化(Bio-Rad C1000,美国),设置的温度梯度详见表 3,同时设置双蒸水为模板的阴性对照,并从梯度扩增中优选扩增条带明显、特异性强的退火温度作为优选引物扩增体系中的最适退火温度。每对引物设置 10 次重复。扩增产物送北京擎科生物技术有限公司进行测序以验证。

表 3 各引物对梯度温度设置

Table 3 Gradient temperatures for different primer pairs

引物对编号 Primer pair no.	梯度温度(℃) Gradient temperature
1, 7, 14	57.0, 57.5, 58.7, 61.0, 63.0, 65.3, 66.5, 67.0
2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13	47.0, 47.5, 48.7, 51.0, 53.0, 55.3, 56.5, 57.0
9, 10	40.0, 40.5, 41.7, 44.0, 46.0, 48.7, 49.5, 50.0

引物对编号见表 2。For primer pair no., see Table 2.

#### 1.4 优选扩增引物的扩增稳定性和灵敏度检测

采用 4 对优选引物及其对应的扩增体系,以 1.3 节中携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液侵染的黄瓜叶片阳性 cDNA 原液为模板,进行引物及体系的扩增稳定性检测,每对引物扩增设置 10 次重复。同时,将该 cDNA 模板原液(1 021.64 ng/μL)按照梯度 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1 024, 2 048, 4 096 和 8 192 倍稀释,然后用 1.3 节筛选出来的优选引物及其扩增体系进行 PCR 扩增灵敏度检测。PCR 反应体系: 2 × Es Taq MasterMix 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 阳性 cDNA 模板 1 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足到总体积 20 μL。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物上样 6 μL 进行凝胶电泳检测,确定引物进行 PCR 扩增时所能检测到的最低的 cDNA 模板浓度,即检测引物特异性扩增的灵敏度。

#### 1.5 优选引物对田间样本的检测

对采自全国不同地区的 13 份包括蔬菜和瓜类作物上的疑似感染 CCYV 的带有症状的叶片和不同作物上的烟粉虱成虫的田间样本(表 1),叶片及烟粉虱成虫的 RNA 提取、cDNA 合成均参照 1.3 节所述。田间样本的 cDNA 分别采用筛选的 4 对优选引物及其对应的最优退火温度进行 PCR 扩增,扩增体

系和扩增程序同 1.4 节。同时设置双蒸水作为模板的阴性对照。扩增产物取 6 μL 在凝胶电泳上检测明确田间烟粉虱种群及植物对 CCYV 的感染状况,由计算公式(阳性样本数/检测总样本数) × 100%, 计算 CCYV 的携带率,同时验证所筛选出特异性引物对田间样本检测的适合性和稳定性。

## 2 结果

### 2.1 最优引物的筛选及退火温度的优化

PCR 扩增结果表明,引物对 1, 5, 8, 12 和 13 均可从携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液及其侵染的黄瓜叶片的阳性 cDNA 模板中扩增到预期的目标条带;进一步考虑扩增条带的特异性和亮度,选取了引物对 5, 8, 12 和 13 扩增的目标条带回收纯化后进行测序,测序结果显示,扩增产物序列为 CCYV 的 DNA 序列,扩增产物条带长度分别为 709, 1 515, 152 和 343 bp(图 1)。

对筛选获得的 4 对引物对进行 PCR 退火温度的优化,引物对 5, 8, 12 和 13 的优化退火温度均为 56℃。在上述优化温度条件下,各引物对扩增特异性和重复性强(图 1),适合用于 CCYV 的稳定检测。

### 2.2 优选引物及扩增条件的稳定性检测

在获得优选引物及其优化的 CCYV 扩增体系的基础上,对引物及其扩增稳定性进行检测。结果发现,4 对引物在其优化的扩增程序下,对携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液侵染的黄瓜叶片阳性 cDNA 模板均可实现稳定扩增,且扩增条带特异性强(图 2)。

### 2.3 优选引物对 CCYV 的扩增灵敏度检测

在获得优化的 CCYV 扩增体系的基础上,对 4 对优选引物的扩增灵敏度进行检测,4 对优选引物对稀释 4 096 倍的携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液侵染的黄瓜叶片阳性 cDNA 模板仍可扩增到微弱条带(图 3),检测浓度为 0.25 ng/μL,在大于此浓度范围内 4 对优选引物均可扩增到目标条带,而引物对 5, 12 和 13 可以达到检测模板浓度低至 0.125 ng/μL(稀释 8 192 倍)的灵敏度,说明所筛选的 4 对引物及其对应的检测体系,对最低 cDNA 模板浓度为 0.25 ng/μL 的测试样本均可以实现稳定检测。

### 2.4 田间寄主植物叶片及烟粉虱的 CCYV 感染率

采集田间的 13 份疑似感染 CCYV 的瓜类植物叶片及田间的烟粉虱成虫,分别采用上述 4 对优选

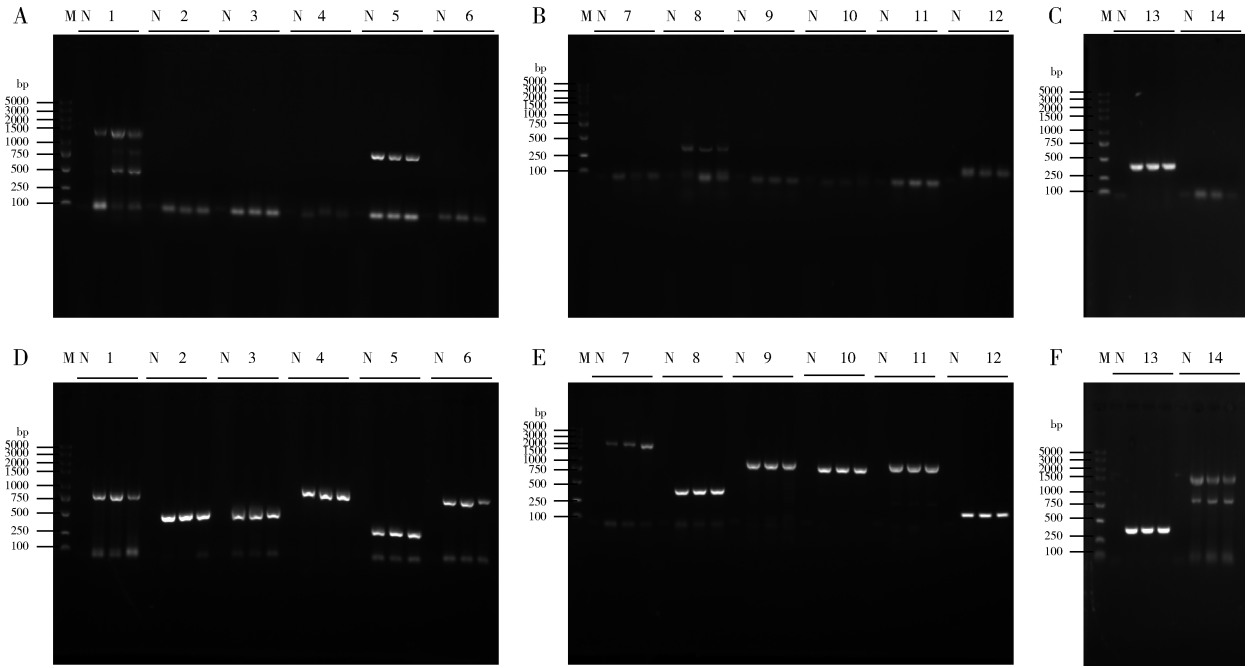


图1 不同引物对携带 CCYV 的根癌农杆菌 GV3101 菌液(A, B, C)及其侵染的黄瓜叶片的阳性 cDNA (D, E, F)的 PCR 扩增  
 Fig. 1 PCR amplifications of bacterial solution of *Agrobacterium tumefaciens* carrying CCYV (A, B, C) and cDNAs from CCYV-infected cucumber leaves (D, E, F) using different primer pairs  
 M; DNA Marker DL5000; 1-14; 分别为以阳性 cDNA 为模板用表 2 中的引物对 1~14 的扩增产物 Amplification products using positive cDNA as the template with primer pairs 1-14 in Table 2, respectively; N: 以双蒸水为模板, 阴性对照 H<sub>2</sub>O as the template (negative control).

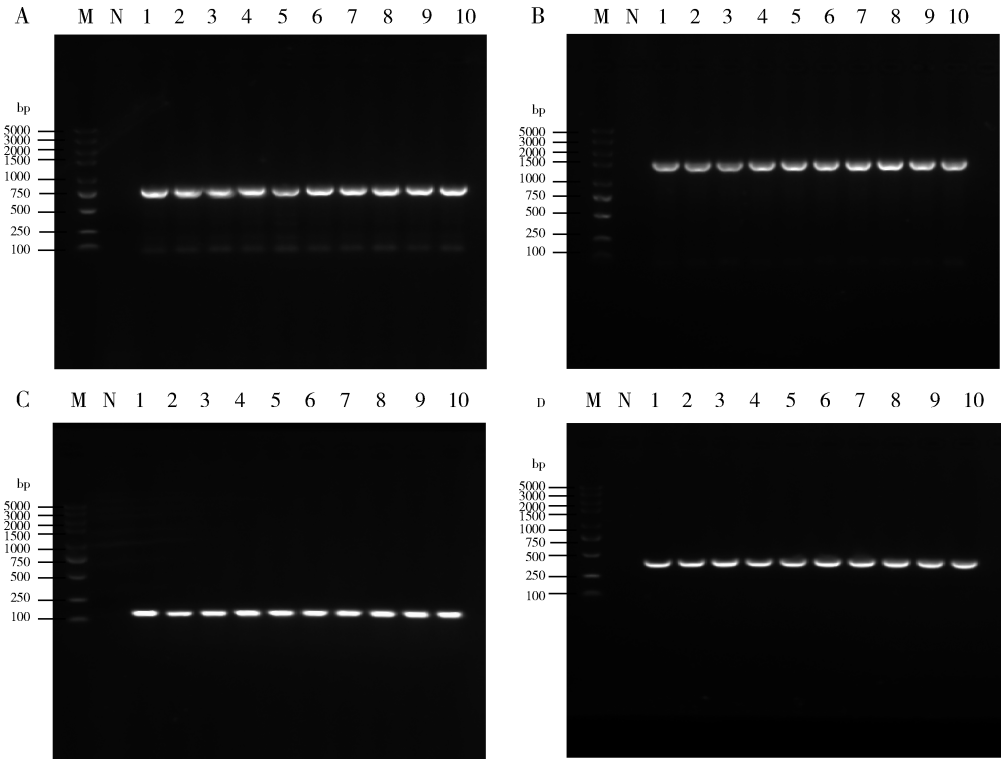


图2 4对优选引物对携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液侵染的黄瓜叶片的阳性 cDNA 模板的 PCR 扩增结果  
 Fig. 2 PCR amplification of positive cDNA template from the cucumber leaves infected by *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 carrying CCYV using four primer pairs selected

A-D: 分别为优选引物对 5, 8, 12 和 13(见表 2)的 PCR 扩增结果 PCR amplification results with the primer pairs 5, 8, 12, and 13 (see Table 2), respectively. M: DNA Marker DL5000; N: 以双蒸水为模板, 阴性对照 H<sub>2</sub>O as the template (negative control); 1-10: 以阳性 cDNA 为模板的 10 次重复扩增结果 10 replicates of amplification with positive cDNA as the template.

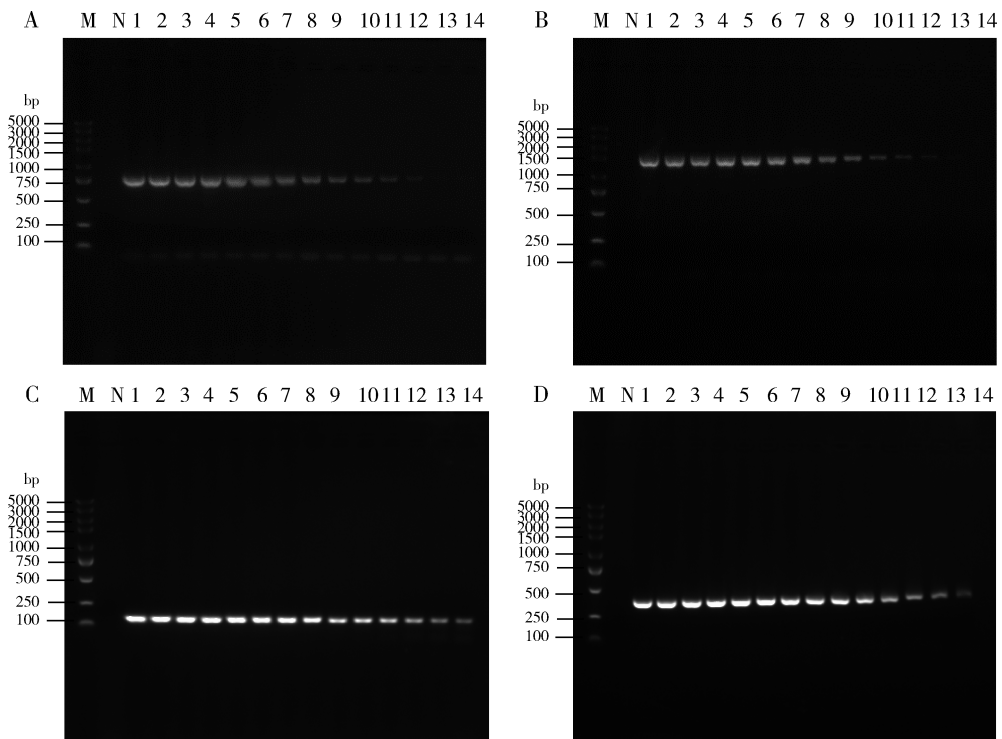


图 3 4 对优选引物对 CCYV 的 PCR 扩增灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity of PCR amplification of CCYV with four pairs of primers selected

A, B, C, D: 分别为引物对 5, 8, 12 和 13(见表 2)的 PCR 扩增结果 PCR amplification results with the primer pairs 5, 8, 12, and 13 (see Table 2), respectively. M: DNA Marker DL5000; N: 以双蒸水为模板, 阴性对照 H<sub>2</sub>O as the template (negative control); 1-14: 分别为携带 CCYV 的 GV3101 根癌农杆菌菌液侵染的黄瓜叶片阳性 cDNA 模板(1 021.64 ng/μL)依次稀释 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1 024, 2 048, 4 096 和 8 192 倍的 PCR 扩增产物 PCR amplification product of the positive cDNA templates (1 021.64 ng/μL) from cucumber leaves infected by *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 carrying CCYV in 1-, 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512-, 1 024-, 2 048-, 4 096-, and 8 192-fold dilution, respectively.

引物及其优化的扩增体系进行检测。结果表明,引物对 5, 8, 12 和 13 对叶片或烟粉虱成虫样本是否携带 CCYV 病毒的检测结果是完全一致的;对于扩增到阳性条带的样本,扩增条带同时采用直接测序法确认了其检测结果的准确性和可靠性。结果说明这 4 对优选引物及其对应的扩增体系均可用于田间 CCYV 的快速检测。

田间 13 份样本检测结果表明,2019 年在新疆和田、河南武陟、山东寿光、天津武清、陕西安康、海南海口、海南三亚、湖南长沙、北京海淀等地区的 9 份烟粉虱种群及其疑似带毒叶片中感染了 CCYV, 田间样本的 CCYV 阳性率 69.23%。5-7 月份采集自北京海淀、湖南长沙、江西赣州的烟粉虱及其植株叶片中对 CCYV 的检测结果为阴性,说明未携带 CCYV。除了 5 月份采集自海南烟粉虱测试种群外,其他检测到 CCYV 阳性的新疆和田、河南武陟、山东寿光、湖南长沙和北京海淀的烟粉虱及其取食的植株叶片均采集于秋季(表 1),说明除海南地区外,我

国华中、华北等北方地区的秋季均为 CCYV 易感期。

### 3 讨论

CCYV 是由近年来发生的、由烟粉虱半持久性传播的植物病毒病(Gu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016), 逐渐在中国扩散蔓延和为害(王青等, 2018)。植物感染病毒病初期,其症状表现不易识别,需采用分子生物学方法和技术进行检测才能明确其感染情况。在对 CCYV 的相关研究中,不同文献中采用的引物序列及其扩增条件各不相同,而本文作者在前期预备试验中发现,不同文献中的引物和扩增条件对同一靶标生物的检测结果不一致,分析可能与有些扩增引物的筛选和应用具有靶标生物的特异性有关。例如,大部分基于 CCYV 病毒的外壳蛋白设计引物对通过根癌农杆菌注射法获得的 CCYV 阳性植株的早期检测相对困难,但对田间的携毒植物或烟粉虱种群则可成功扩增,且扩增特异

性强(数据未示),可能是由于注射法获得的植株病毒 CP 蛋白表达含量比较低、不足以成功检测到。因此,筛选获得可以从不同途径感染的 CCYV 靶标对于该病毒的快速准确发现和防控意义重大。

为了能够实现对根癌农杆菌侵染获得的阳性菌株和田间自然染毒样品的同时稳定扩增,本文建立了基于此的引物筛选标准,筛选获得的 4 对优选引物(引物对 5, 8, 12 和 13)可用于 CCYV 的稳定检测,无论是对阳性菌液,或对于田间携毒植株、田间烟粉虱试虫等靶标,均可实现对 CCYV 的稳定、特异性扩增及快速检测,且能够成功扩增到的最低 cDNA 模板浓度为  $0.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,与以往研究中寄生蜂识别鉴定时的最低检测浓度  $7.812 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (张锐锐等, 2012)相比,浓度还低至少 30 倍。本研究所建立的体系的最低检测剂量虽然高于荧光定量 PCR 技术的检测灵敏度或其他植物病毒种类的检测最低剂量(宋震等, 2017),但选择这些优选引物中的任何一对及其对应的扩增程序均可以实现对田间植物感染 CCYV 或其媒介昆虫烟粉虱的携毒性和携毒率检测,进而针对性制定对烟粉虱及其传毒为害的早期防控。

本研究采用优选引物对采集自我国 11 个地区的共计 13 份烟粉虱及疑似带毒植株叶片进行检测,发现全年温度较暖的海南地区 5 月份采集的烟粉虱及其取食的植物叶片均感染了 CCYV,这可能与 5 月份海南温度高、烟粉虱适合发生有关(王原等, 2018)。根据以往报道,2016 年海南番茄和黄瓜上的 Q 型烟粉虱携带 CCYV 的比例分别达到了 65.0% 和 55.0%(Tang *et al.*, 2017),说明近年来海南省的 CCYV 发生率高,生产上需要引起极大重视,做好预防措施。然而,其他采样地区不同,春季瓜类作物上 CCYV 发生率极低或不发生,而秋季瓜类作物上发生 CCYV 的感染率很高,说明秋季瓜类作物感染 CCYV 的风险远远高于春季,这可能与此类烟粉虱种群的高发生数量及其种群密度密切相关(刘珊珊等, 2013)。对于采集于番茄植株上的烟粉虱我们也检测到 CCYV 病毒,我们猜测可能是烟粉虱从其他寄主植物上带毒。本研究中,新疆和田地区检测的甜瓜上烟粉虱携带有 CCYV 病毒,结合已发表文献(彭斌等, 2017),说明新疆和田及吐鲁番地区 8-9 月份哈密瓜上该病毒病高发,发病率可高达 80%。因此,秋季应特别警惕烟粉虱及其传播的 CCYV 的发生危害,防控措施上需首先降低烟粉虱种群数量。本研究中还发现,山东寿光和海南三亚

地区的烟粉虱种群分别采自番茄和茄子作物,但这两种作物上的烟粉虱种群仍被检测到携带 CCYV 病毒,与以往报道(Tang *et al.*, 2017)类似,说明不感染 CCYV 的植物上的烟粉虱仍然有携毒风险,如果此类烟粉虱种群扩散到瓜类作物或其他可感毒寄主植物上,由带毒烟粉虱传播导致植物感染病毒病的风险会很高。从瓜类作物种类上来看,目前国内外均有报道该病毒在黄瓜上的侵染(Bananej *et al.*, 2013; 干射香等, 2019)。本研究检测到甜瓜和黄瓜叶片上均有 CCYV 的感染,而在生产实践及以往报道中,田间甜瓜上出现疑似 CCYV 感染症状的比例更高(乔宁等, 2015; 彭斌等, 2017),表明甜瓜可能更易于感染该病毒,但 CCYV 在甜瓜、西瓜、丝瓜、黄瓜等不同瓜类作物上的感染效率比较研究需要进一步试验和明确。除了瓜类作物,值得关注的是我国海南三亚地区崖城镇和天涯镇的空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 也检测到感染了 CCYV(Tang *et al.*, 2017),说明该病毒的染毒植物谱可能还在扩大。

我国最初于 2011 年报道 CCYV 的发生(Gu *et al.*, 2011),这与 Q 型烟粉虱被发现大范围、快速取代 B 型烟粉虱而成为优势种类的报道时间基本一致(Pan *et al.*, 2011)。本研究所检测的烟粉虱均为 Q 型烟粉虱。研究发现,CCYV 可以直接或间接地影响烟粉虱的取食偏好性,并且能够增强烟粉虱的取食效率(卢少华等, 2015);Q 型烟粉虱比 B 型烟粉虱对植物非韧皮部探查和韧皮部唾液分泌增多(Lu *et al.*, 2019),且 Q 型烟粉虱的传毒能力更强(Lu *et al.*, 2017)。因此,目前在我国 Q 型烟粉虱替代 B 型烟粉虱而占优势为害种类可能是导致 CCYV 病毒在我国发生和扩散蔓延的主要原因之一,烟粉虱携毒的早期发现及防控对于阻断 CCYV 病毒的进一步扩散为害极为重要。

## 参考文献 (References)

- Abrahamian PE, Seblani R, Sobh H, Abou-Jawdah Y, 2013. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 193(2): 320-326.
- Bananej K, Menzel W, Kianfar N, Vahdat A, Winter S, 2013. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber, melon, and squash in Iran. *Plant Dis.*, 97(7): 1005.
- Boykin LM, 2014. *Bemisia tabaci* nomenclature: lessons learned. *Pest Manag. Sci.*, 70(10): 1454-1459.
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005. Sequence analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different



- geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Sci. Agric. Sin.*, 38(1): 76–85. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 38(1): 76–85]
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 1–19.
- Gan SX, Wu SH, Zhao WH, Tu LQ, Fan XY, Cheng ZB, Zhang SB, Zhu XP, Zhou YJ, Ji YH, 2019. Characterization of the genomic sequences of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucumber from Shandong province. *Acta Phytopathol. Sin.*, online publication on 2019-07-22; DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000420. [干射香, 吴淑华, 赵文浩, 涂丽琴, 范小燕, 程兆榜, 章松柏, 竺晓平, 周益军, 季英华, 2019. 瓜类褪绿黄化病毒山东黄瓜分离物基因组序列克隆及特征分析. 植物病理学报, 2019-07-22 网络出版; DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000420]
- Gu QS, Liu YH, Wang YH, Huangfu WG, Gu HF, Xu L, Song FM, Brown JK, 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. *Plant Dis.*, 95(1): 73.
- Gyoutoku Y, Okazaki S, Furuta A, Etoh T, Mizobe M, Kuno K, Okuda M, 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new crinivirus. *Jpn. J. Phytopathol.*, 75(2): 109–111.
- Hamed K, Menzel W, Dafalla G, Gadelseed AMA, Winter S, 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. *Plant Dis.*, 95(10): 1321.
- Huang LH, Tseng HH, Li JT, Chen TC, 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan. *Plant Dis.*, 94(9): 1168.
- Jiu M, Hu J, Wang LJ, Dong JF, Song YQ, Sun HZ, 2017. Cryptic species identification and composition of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in Henan Province, China. *J. Insect. Sci.*, 17(3): 78.
- Keshavarz T, Shams-Bakhsh M, Izadpanah K, Malboobi MA, 2014. Occurrence and genome analysis of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in Iran. *J. Phytopathol.*, 162(7–8): 523–526.
- Kubota K, Usugi T, Tsuda S, 2011. Production of antiserum and immunodetection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. *J. Gen. Plant Pathol.*, 77(2): 116–120.
- Li JJ, Liang XZ, Wang XL, Shi Y, Gu QS, Kuo YW, Falk BW, Yan FM, 2016. Direct evidence for the semipersistent transmission of *Cucurbit chlorotic yellows virus* by a whitefly vector. *Sci. Rep.*, 6: 36604.
- Li M, Chen XH, Li YM, Chen XL, Zeng DG, Jiang WM, Peng M, Ma N, 2008. Detection of Taura syndrome virus for shrimp in Guangxi province inshore and its analysis of false positive. *Southwest China J. Agric. Sci.*, 21(5): 1447–1449. [黎铭, 陈晓汉, 李咏梅, 陈秀荔, 曾地刚, 蒋伟明, 彭敏, 马宁, 2008. 广西沿海地区对虾桃拉病毒(TSV)检测及假阳性分析. 西南农业学报, 21(5): 1447–1449]
- Lin YY, Yin YP, Chen SQ, Wang ZK, 2012. Comparative of citrus huanglongbing molecular detection approaches and monitoring of the orchards. *Acta Phytophyl. Sin.*, 39(6): 503–507. [林亚玉, 殷幼平, 陈世钦, 王中康, 2012. 三种分子检测体系的比较及柑橘果园黄龙病监测. 植物保护学报, 39(6): 503–507]
- Liu SS, Peng B, Wu HJ, Liu TJ, Kong XY, Shi Y, Gu QS, 2013. Molecular identification of *Cucurbit chlorotic yellow virus* in Hainan and Henan province. *J. Fruit Sci.*, 30(2): 291–293. [刘珊珊, 彭斌, 吴会杰, 柳唐镜, 孔祥义, 施艳, 古勤生, 2013. 海南省和河南省发生甜瓜褪绿黄化病的分子鉴定. 果树学报, 30(2): 113–115]
- Lu S, Chen M, Li J, Shi Y, Gu Q, Yan F, 2019. Changes in *Bemisia tabaci* feeding behaviors caused directly and indirectly by cucurbit chlorotic yellows virus. *Virol. J.*, 16: 106.
- Lu SH, Li JJ, Liu MY, Wang XL, Yan FM, 2015. Effect of *Cucurbit chlorotic yellows virus* on *Bemisia tabaci* feeding behaviors. *Central China Insect Res.*, 11: 310–311. [卢少华, 李静静, 刘明杨, 王雪丽, 闫凤鸣, 2015. 瓜类褪绿黄化病毒对烟粉虱取食行为的影响. 华中昆虫研究, 11: 310–311]
- Lu SH, Li JJ, Wang XL, Song DY, Bai R, Shi Y, Gu QS, Kuo YW, Falk BW, Yan FM, 2017. A semipersistent plant virus differentially manipulates feeding behaviors of different sexes and biotypes of its whitefly vector. *Viruses*, 9(1): 4.
- Ning WX, Shi XB, Liu BM, Pan HP, Wei WT, Zeng Y, Sun XP, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Cheng JX, Peng ZK, Zhang Y, 2015. Transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by *Bemisia tabaci* as affected by whitefly sex and biotype. *Sci Rep.*, 5: 10744.
- Orfanidou C, Maliogka VI, Katis NI, 2014. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece. *Plant Dis.*, 98(10): 1446.
- Pan HP, Chu D, Ge DQ, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Jiao XG, Liu BM, Yang N, Yang X, Su Q, Xu BY, Zhang YJ, 2011. Further spread of and domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China. *J. Econ. Entomol.*, 104(3): 978–985.
- Peng B, Liu LM, Liu SS, Zhang YH, Ji YL, Wu Y, Zhang XJ, Gu QS, 2017. The genome of *Cucurbit chlorotic yellows virus* from Xinjiang autonomous region of China. *Acta Phytopathol. Sin.*, 47(6): 730–737. [彭斌, 刘莉铭, 刘珊珊, 张以和, 吉艳玲, 吴洋, 张学军, 古勤生, 2017. 瓜类褪绿黄化病毒新疆分离物基因组分析. 植物病理学报, 47(6): 730–737]
- Polston JE, De Barro PJ, Boykin LM, 2014. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. *Pest Manag. Sci.*, 70(10): 1547–1552.
- Qiao N, Wei JP, Li MQ, Liu YG, Jiang HX, Zhu XP, Tian SB, 2015. Molecular detection and identification of two melon viruses from Shouguang. *Plant Prot.*, 41(5): 130–133. [乔宁, 魏家鹏, 李美芹, 刘永光, 姜会霞, 竺晓平, 田素波, 2015. 两种甜瓜病毒寿光分离物的分子检测与鉴定. 植物保护, 41(5): 130–133]
- Shi Y, Gu Q, Yan F, Sun X, Li H, Chen L, Sun B, Wang Z, 2016. Infectious clones of the crinivirus cucurbit chlorotic yellows virus are competent for plant systemic infection and vector transmission. *J. Gen. Virol.*, 97(6): 1458–1461.

- Song Z, Liu KH, Chen HM, Wang YJ, Li ZA, Zhou CY, 2017. Development and application of a one-step reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. *J. Plant Prot.*, 44(1): 175–176. [宋震, 刘科宏, 陈洪明, 王艳娇, 李中安, 周常勇, 2017. 柑橘黄化脉明病毒一步法 RT-qPCR 检测体系的建立及应用. 植物保护学报, 44(1): 175–176]
- Sun X, Wang Z, Gu Q, Li H, Han W, Shi Y, 2017. Transcriptome analysis of *Cucumis sativus* infected by Cucurbit chlorotic yellows virus. *Virology*, 14: 18.
- Tang X, Shi XB, Zhang DY, Li F, Yan F, Zhang YJ, Liu Y, Zhou XG, 2017. Detection and epidemic dynamic of ToCV and CCYV with *Bemisia tabaci* and weed in Hainan of China. *Virology*, 14: 169.
- Wang Q, Li JJ, Lu SH, Zhang ZL, Su PL, Yan FM, 2018. Research progress on tripartite interactions among *Cucurbit chlorotic yellows virus* vector insect plants. *Central China Insect Res.*, 14: 23–28. [王青, 李静静, 卢少华, 张泽龙, 苏攀龙, 闫凤鸣, 2018. 瓜类褪绿黄化病毒-介体-植物互作研究进展. 华中昆虫研究, 14: 23–28]
- Wang Y, Lv ZC, Wan FH, 2018. The establishment of the CRISPR/Cas9 system in *Bemisia tabaci* and the application in the identification of temperature tolerance function of transient receptor potential gene. *Chin. J. Biol. Control*, 34(2): 254–258. [王原, 吕志创, 万方浩, 2018. 烟粉虱 CRISPR/Cas9 系统的建立及其在 Bt TRP 基因温度耐受性功能验证中的应用. 中国生物防治学报, 34(2): 254–258]
- Wang ZY, Gu QS, Sun H, Li HL, Sun BJ, Liang XZ, Yuan Y, Liu RL, Shi Y, 2014. One-step reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*. *J. Virol. Methods*, 195: 63–66.
- Wintermantel WM, Jenkins Hladky LL, Fashing P, Ando K, McCreight JD, 2019. First report of Cucurbit chlorotic yellows virus infecting melon in the new world. *Plant Dis.*, 103(4): 778.
- Yang SA, Li ZB, Qin BX, Xie HT, Cui LX, Su Q, Deng TJ, Cai JH, 2017. Molecular detection and identification of three viruses isolated from melons in Guangxi. *Plant Prot.*, 43(3): 83–89. [杨世安, 李战彪, 秦碧霞, 谢慧婷, 崔丽贤, 苏琴, 邓铁军, 蔡健和, 2017. 广西三种甜瓜病毒分离物的分子检测与鉴定. 植物保护, 43(3): 83–89]
- Yuan Y, Zhao T, Liang XZ, Shi Y, 2012. Study on the correlation between CCYV accumulation and symptom development in melon leaves. *J. Henan Agric. Univ.*, 46(6): 655–657. [袁媛, 赵特, 梁相志, 施艳, 2012. 甜瓜病叶 CCYV 积累量与叶片症状表现的相关性研究. 河南农业大学学报, 46(6): 655–657]
- Zeng R, Xu LH, Gu HF, Lu JP, Dai FM, 2014. Prokaryotic expression of coat protein of Cucurbit chlorotic yellow virus and its antiserum preparation. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 30(22): 276–281. [曾蓉, 徐丽慧, 顾海峰, 陆金萍, 戴富明, 2014. 瓜类黄化褪绿病毒上海分离物外壳蛋白的原核表达及其抗血清的制备. 中国农学通报, 30(22): 276–281]
- Zhang RN, Li YY, Li DW, Yu JL, Han CG, 2012. The genome of *Cucurbit chlorotic yellows virus* isolated from Beijing of China. In: Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Protection (2012). China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 628. [张汝楠, 李源源, 李大伟, 于嘉林, 韩成贵, 2012. 瓜类褪绿黄化病毒 (CCYV) 北京分离物基因组序列分析. 见: 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社. 628]
- Zhang RR, Zhang GF, Xian ZH, Wan FH, 2012. SCAR marker for rapid identification of *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(12): 1386–1393. [张锐锐, 张桂芬, 贤振华, 万方浩, 2012. 基于 SCAR 标记技术的丽蚜小蜂快速识别. 昆虫学报, 55(12): 1386–1393]

(责任编辑: 马丽萍)