

马铃薯帚顶病毒 PMTV 三重 RT-PCR 检测体系的建立及应用

孙旭红¹, 张金鹏¹, 王磊¹, 李明雪¹, 丁凯鑫¹,
李志新¹, 杨梦平¹, 白艳菊², 宋继玲¹

(1. 黑龙江省农业科学院克山分院·国家马铃薯种质资源试管苗库(克山) 黑龙江齐齐哈尔 161600;
2. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所 哈尔滨 150086)

摘要: 马铃薯帚顶病毒(potato mop-top virus, PMTV)是马铃薯重要的检疫性病毒,严重危害马铃薯的产量和品质。为高效、灵敏地检测马铃薯中的 PMTV,本研究基于 PMTV 编码复制(RNA1)、外壳蛋白(RNA2)和移动(RNA3)的三条独立基因组 RNA,针对 RNA1 设计特异性引物,筛选 RNA2 与 RNA3 已发表引物,并优化反应条件,成功构建 PMTV 的三重逆转录聚合酶链式反应即 RT-PCR 检测体系。该检测体系对 PMTV 具有高灵敏度和强特异性,最低检测限为 $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA,且可同时检测到 RNA1(265 bp)、RNA2(460 bp)和 RNA3(769 bp)3 段目的基因,无交叉反应。利用该检测体系对来自云南、广东、贵州等地的 200 份马铃薯样品进行检测,共发现 24 份阳性样本,阳性率为 12%。该体系可稳定检测不同组织类型(叶片、试管苗、块茎)样品,适用于田间样本快速筛查与种薯质量监测。此外,基于 9 份阳性样本的 3 段目的基因序列构建的系统进化树显示,我国 PMTV 分离株分布于多个进化分支,提示其可能存在不同来源或本地适应性演化。本研究建立的三重 RT-PCR 检测体系为 PMTV 的快速检测、分子流行病学调查及种薯健康认证提供了可靠技术手段。

关键词: 马铃薯;帚顶病毒;三重;RT-PCR 检测

中图分类号:S532

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2026)08-203-09

Establishment and application of triple RT-PCR detection method for potato mop-top virus

Sun Xuhong¹, Zhang Jinpeng¹, Wang Lei¹, Li Mingxue¹, Ding Kaixin¹, Li Zhixin¹, Yang Mengping¹, Bai Yanju², Song Jiling¹

(1. Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Test-Tube Plantlet Bank of National Potato Germplasm Resources (Keshan), Qiqihar 161600, Heilongjiang, China; 2. Economic Crop Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: Potato mop-top virus (PMTV) is an important quarantine virus of potato, causing severe damage to both yield and quality. For efficient and sensitive detection of PMTV in potato, this study developed a triple RT-PCR assay based on the three independent genomic RNAs of PMTV, which encode the replication (RNA1), coat protein (RNA2), and movement (RNA3). Specifically, specific primers were designed targeting RNA1, while previously published primers for RNA2 and RNA3 were screened. Following optimization of the reaction conditions, a triple reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection system for PMTV was successfully established. The developed assay exhibited high sensitivity and strong specificity for PMTV detection, with a detection limit of $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA. It successfully

收稿日期:2025-12-02;修回日期:2026-05-07

基金项目: 齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(LNYGG-2024006);黑龙江省农业科技创新跨越工程农业科技基础创新优青项目(CX22YQ31);齐齐哈尔市科学技术计划重点项目(ZDGG-202210);黑龙江省农业科技创新跨越工程农业关键技术科技创新重点攻关项目(CX23GG11);科技部、财政部国家科技资源共享服务平台项目(NCGRC-2025-44);财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-09-P16)

作者简介: 孙旭红,女,助理研究员,研究方向为作物遗传育种。E-mail:xuhong1118@163.com

共同第一作者: 张金鹏,男,助理研究员,研究方向为马铃薯种质资源保护与利用。E-mail:penguins3217@163.com

通信作者: 宋继玲,女,副研究员,研究方向为马铃薯种质资源保护与利用。E-mail:jl_song929@126.com

白艳菊,女,研究员,研究方向为植物病理学。E-mail:yanjubai@163.com

and simultaneously amplified the three target genes: RNA1 (265 bp), RNA2 (460 bp), and RNA3 (769 bp), without any cross-reactivity. Using this detection system, a total of 200 potato samples collected from Yunnan, Guangdong, Guizhou and other regions were tested, revealing 24 positive samples with a positive rate of 12%. The developed assay demonstrated reliable detection across various tissue types, including leaves, *in vitro* plantlets, and tubers, making it suitable for rapid field screening and seed potato quality monitoring. Furthermore, phylogenetic analysis based on three target nucleotide sequences of nine positive samples revealed that Chinese PMTV isolates were distributed across multiple evolutionary clades, suggesting possible diverse origins or local adaptive evolution. The triplex RT-PCR detection system established in this study provides a reliable technical tool for rapid detection of PMTV, molecular epidemiological surveillance, and seed potato health certification.

Key words: Potato; PMTV; Triple; RT-PCR detection

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)作为世界第四大粮食作物,因具有生育期短、产量高、适应性强、营养价值高等特点,在我国东北、西北、华北、西南、南方等地区广泛种植。2017—2021年,我国马铃薯种植面积和产量均有增加,5年中马铃薯产量增长了8.75%、面积增长了2.23%^[1]。在耕地面积无法扩增的条件下,产量与面积都实现增长,更加证明了马铃薯的重要地位。马铃薯病毒病严重危害马铃薯的产量和品质,是制约中国马铃薯产业健康持续发展的重要因素之一。其中,马铃薯帚顶病毒(potato mop-top virus, PMTV)是马铃薯的重要检疫性病毒^[2],侵染马铃薯后,在叶片上形成不规则的黄色斑纹或褪绿“V”形斑;导致植株节间缩短,叶片簇集,形似笤帚顶;块茎内部呈铁锈色环状或弧形坏死斑,发病严重时造成薯块畸形,表皮产生网状开裂与褐斑,严重影响马铃薯的商品价值^[3-4]。PMTV最早于1996年在苏格兰被鉴定并报道,随后其分布范围扩展至北美、南美、亚洲、欧洲以及非洲部分地区的马铃薯种植区^[5]。迄今为止,在中国 PMTV 未见大规模流行,得益于国内针对该检疫性病害的严格管控,仅有零星地区检测到 PMTV 的存在^[6]。PMTV 主要依赖马铃薯粉痂菌(*Spongospora subterranea*)进行传播,粉痂菌是 PMTV 最重要的传播介体^[7]。同时,由于粉痂菌偏好冷凉环境,PMTV 的地理分布也与之高度重叠,多发生于气候凉爽、土壤疏松的砂质土地区^[8]。

PMTV 是帚状病毒科(Virgaviridae)马铃薯帚顶病毒属(*Pomovirus*)的模式种,其病毒颗粒为直杆状或杆菌状,长度为100~300 nm,直径为18~20 nm。PMTV 基因组由3个正义单链RNA组成,分别为6.1 kb的RNA1、3.1 kb的RNA2、2.9 kb的RNA3^[9]。其中RNA1编码RNA复制酶,RNA2编码20 kDa的外壳蛋白(coat protein, CP)和67 kDa的通读蛋白(read-through protein, CP-RT),其中CP

与 PMTV 的症状产生有关,CP-RT 是依赖土传真菌传播的病毒的共同特征^[10],Reavy 等^[11]研究发现 RNA2 编码的 CP-RT 的缺失,致使 PMTV 不能通过粉痂菌传播。RNA3 编码三重基因块(triple gene block, TGB)和富半胱氨酸蛋白(cysteine-rich protein, CRP),TGB 由3个部分重叠的 TGB1、TGB2 和 TGB3 组成,TGB1 蛋白介导 PMTV 细胞间移动和长距离运输,同时 TGB1 依赖于 TGB2 和 TGB3 蛋白的协同作用,任何一个运动蛋白的缺失都会严重损害病毒的移动能力^[12-14],CRP 具有 RNA 沉默抑制功能,在 PMTV 侵染过程中能够降低寄主的 RNA 沉默能力^[15]。

目前,针对 PMTV 的检测方法主要有指示植物鉴定法、透射电子显微镜镜检法、酶联免疫吸附法以及 PCR 检测技术^[16]。其中指示植物鉴定法受限于 PMTV 侵染过程对环境的高度敏感性,导致试验重复性差,进而造成该方法的诊断准确率低。透射电子显微镜镜检法对相似粒体形态的病毒难以区分,仅可以作为检测 PMTV 的辅助方法。此外,由于 PMTV 在寄主体内分布不均匀,且并非所有感染部位均存在完整的病毒粒子,致使酶联免疫吸附法常出现假阴性结果^[17]。与其他方法相比,PCR 检测技术基于对病毒核酸序列的检测,具有更高的特异性和灵敏度,在 PMTV 的检测应用中表现优异。Xu 等^[17]基于 PMTV 的 CP 基因序列设计引物,建立了相应的分子检测体系,并通过酶联免疫吸附法、指示植物鉴定法以及透射电子显微镜观察进行综合验证,结果表明该检测体系具有高度的准确性。然而,基于 PMTV 单条 RNA 特定区域构建的检测体系存在一定的局限性,当该区域发生自然变异或缺失时,会导致检测体系失效,从而产生假阴性结果,对 PMTV 田间监测和防控构成潜在风险。因此,本研究首次基于 PMTV 基因组的3条单链RNA设计特异性引物,构建了 PMTV 的三重

RT-PCR 检测体系,该体系可同步检测 PMTV 的 3 个基因组片段,通过多靶标互证,显著提高了 PMTV 检测的准确性。同时,应用该检测体系可以明确我国 PMTV 的发生情况,并通过国内外分离株的基因组序列,追溯其地理起源与传播路径,为我国马铃薯产业的健康可持续发展提供强有力的保障。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究于 2017—2018 年在黑龙江省农业科学院克山分院进行。通过自主采集及不同企业和科研单位提供,共获得 200 份马铃薯样品,分别来自中国云南、广东、贵州、内蒙古、四川、河北等马铃薯产区,样品类型包括马铃薯植株、块茎、试管苗等。块茎样品筛选标准为具有弧(环)状坏死、圈纹等疑似 PMTV 侵染症状的块茎。试验阴性对照为经酶联免疫吸附法(ELISA)和 RT-PCR 验证的健康马铃薯块茎,PMTV 阳性对照样品以及马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 M 病毒(PVM)、马铃薯 A 病毒(PVA)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)等 6 种病毒阳性样品均由黑龙江省农业科学院克山分院提供。

1.2 检测引物的设计与筛选

从 GenBank 下载 PMTV 不同分离株的基因组序列,利用 BioEdit 软件进行多序列比对,识别 RNA1 的保守区域。使用 Oligo 7.0 软件在 RNA1 保守区设计 14 对引物,片段大小范围为 150~400 bp,退火温度为 52~60 ℃。针对 RNA2 和 RNA3,筛选已发表的引物(H360/C819^[17]、pmt3- S1/pmt3-A769^[18]),要求 3 对引物的扩增产物长度可区分、退火温度较一致,且无非特异性扩增及交叉反应。最终优化形成单一引物的单重、2 对引物的双重及 3 对引物的三重 RT-PCR 体系。

1.3 总 RNA 提取

参照北京艾德莱生物科技有限公司生产的植物总 RNA 提取试剂盒(RN3301)说明书提取总 RNA。

1.4 总 RNA 质量检测

采用微量分光光度计(NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific)测定总 RNA 浓度(A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.1 之间)。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V, 20 min)检测 RNA 完整性。

1.5 cDNA 第一链的获得

使用 ImProm-II 逆转录酶(普洛麦格生物技术有限公司)合成 cDNA 第一链,反应体系如表 1 所示。反应

程序:37 ℃ 孵育 10 min(引物退火),42 ℃ 延伸 30 min(cDNA 合成),70 ℃ 灭活 5 min,产物保存于 4 ℃。

表 1 cDNA 合成所需试剂与反应体系
Table 1 Reagents and reaction systems required for cDNA synthesis

试剂名称 Reagent name	用量 Volume/ μ L
总 RNA Total RNA	4.0
25 μ mol $\cdot$ L ⁻¹ 随机引物 25 μ mol $\cdot$ L ⁻¹ random primer	1.0
10 mmol $\cdot$ L ⁻¹ 脱氧核苷三磷酸 10 mmol $\cdot$ L ⁻¹ dNTP	1.0
RNasin RNA 酶抑制剂 RNasin RNase inhibitor(40 U $\cdot$ μ L ⁻¹)	0.5~1.0
M-MLV 逆转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase(200 U $\cdot$ μ L ⁻¹)	0.4~1.0
5 $\times$ M-MLV 反转录酶缓冲液 5 $\times$ Reverse Transcriptase M-MLV buffer	5.0
无 RNase 水 RNase free H ₂ O	补充至 20.0 Add to 20.0
总计 Total	20.0

1.6 三重 RT-PCR 体系的建立

分别以 PMTV 阳性及阴性对照 cDNA(2.0 μ L)为模板,建立 25.0 μ L 三重 RT-PCR 体系:12.5 μ L 2 $\times$ Taq PCR Premix(含染料,宝生物工程有限公司),3 对引物(终浓度 0.2 μ mol $\cdot$ L⁻¹,上下游各 0.5 μ L),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,ddH₂O 补至 25.0 μ L。扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 终延伸 8 min,产物保存于 4 ℃。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳(电压 120 V, 30 min)检测。PMTV 阳性目标条带送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.7 引物特异性验证

为验证所设计引物对 PMTV 检测的特异性,首先将引物序列在 NCBI 数据库中进行 BLASTn 比对,以确认其理论特异性。随后,以 PVX、PVM、PVA、PVS、PVY、PLRV 等 6 种常见病毒的马铃薯植株 RNA 为模板进行交叉检测^[19],以评估引物的广谱特异性。

1.8 RT-PCR 检测体系灵敏度测试

将逆转录获得的 PMTV 阳性样品 cDNA(100 ng $\cdot$ μ L⁻¹),进行 10 倍梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-5} 稀释度)。分别采用筛选到的 PMTV 基因组 RNA1、RNA2、RNA3 的特异性引物建立单一引物的单重、双重(RNA2+RNA3)及三重(RNA1+RNA2+RNA3)

RT-PCR 检测体系。对各稀释度模板进行扩增后,通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,以出现清晰可辨目标条带的最高稀释度作为各检测体系的检出限,并比较不同体系间的检测灵敏度差异。

1.9 田间样品的检测应用及块茎分离株的分子鉴定

应用本研究建立的三重 RT-PCR 检测体系,对收集的 200 份马铃薯田间样品进行系统性筛检。将块茎中筛检获得的 PMTV 阳性样品委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,测序结果通过 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与 GenBank 数据库中已登录的 PMTV 参考序列进行核苷酸序列比对,验证本研究建立的三重 RT-PCR 检测体系的准确性。

1.10 数据分析

从 NCBI 数据库下载世界各地 PMTV 代表性分离株的基因组序列,采用 MEGA X 软件基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ)^[15]分别构建 RNA1、RNA2

及 RNA3 的系统进化树,并通过 Bootstrap 检验(1000 次重复)评估各分枝节点的置信度,以明确块茎样品分离株与国内外参考株间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 引物的确定

通过 BLAST 比对和退火温度梯度优化,最终筛选出 3 对特异性引物:RNA1 的 S1-2266/S1-2530(本研究设计)、RNA2 的 H360/C819 及 RNA3 的 pmt3-S1/pmt3-A769。三重 RT-PCR 体系中,3 对引物扩增产物大小分别为 265 bp、460 bp 和 769 bp,无交叉反应或非特异性条带,引物序列及来源详见表 2。

2.2 总 RNA 提取质量检测

提取的总 RNA 经 NanoDrop 检测显示, A_{260}/A_{280} 为 1.9~2.1,表明无蛋白质或有机溶剂污染。1% 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V, 20 min)显示清晰的 28S 和 18S rRNA 条带(图 1),证明 RNA 完整性良

表 2 PMTV 三重 RT-PCR 检测引物
Table 2 Primers used in the PMTV triplex RT-PCR assay

基因组 Genome	引物名称 Primer name	序列 Sequence	产物大小 Product size/bp	来源 Reference
RNA1	S1-2266	GACTCTGCTTCCGCTCAAGTG	265	本研究 This study
	S1-2530	CGCTACCGACCGCTACCA		
RNA2	H360	CATGAAGGCTGCCGTGAGGAAGT	460	[17]
	C819	CTATGCACCAGCCCAGCGTAACC		
RNA3	pmt3-S1	GTATTTCAACTCTACCTAGCCGAG	769	[18]
	pmt3-A769	TCCCGAGGTAGTTCGCTGACCC		

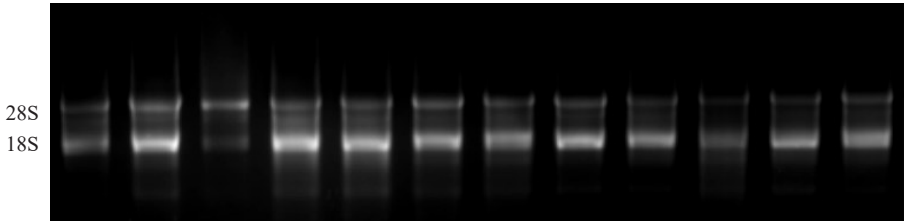


图 1 部分马铃薯块茎总 RNA 凝胶电泳
Fig. 1 Gel electrophoresis of some potato tuber total RNA

好,适用于后续试验。

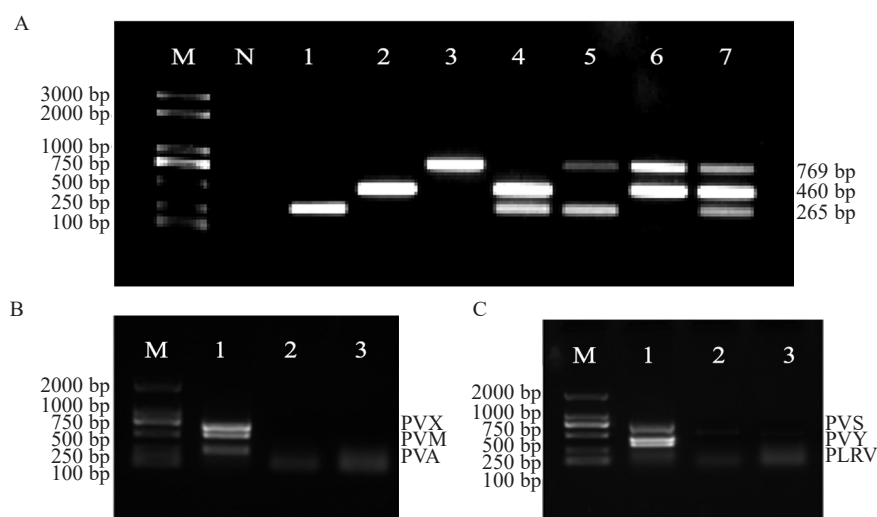
2.3 建立 PMTV 的 PCR 检测体系

单重、双重及三重 RT-PCR 检测结果显示, PMTV 阳性样品中 3 对引物均能特异性扩增目标条带(图 2-A),阴性对照无扩增。三重(泳道 7)和双重体系(泳道 4~6)可同时检测三条和两条 RNA 片段,与单重体系(泳道 1~3)相比,未出现引物间干扰现象。此外, PMTV 阳性样品中未检出 PVX、PVM、PVA、PVS、PVY、PLRV 等 6 种常见病毒(图 2-B 和

图 2-C),证明该体系特异性良好。上述结果表明,单独使用 1 对引物时,能够成功检测到 PMTV。当使用 2 对或全部 3 对引物时, PMTV 阳性样品中能够同时检测到 PMTV 的 2 条或 3 条 RNA 序列,进一步验证了该检测体系的高效性和准确性。

2.4 RT-PCR 检测体系的灵敏度测试

将逆转录得到的 PMTV 阳性样品的 cDNA (100 ng·μL⁻¹)连续稀释 10 倍(10⁻¹~10⁻⁵稀释度),灵敏度测试结果如图 3 所示,单重(图 3-A~C)与三重

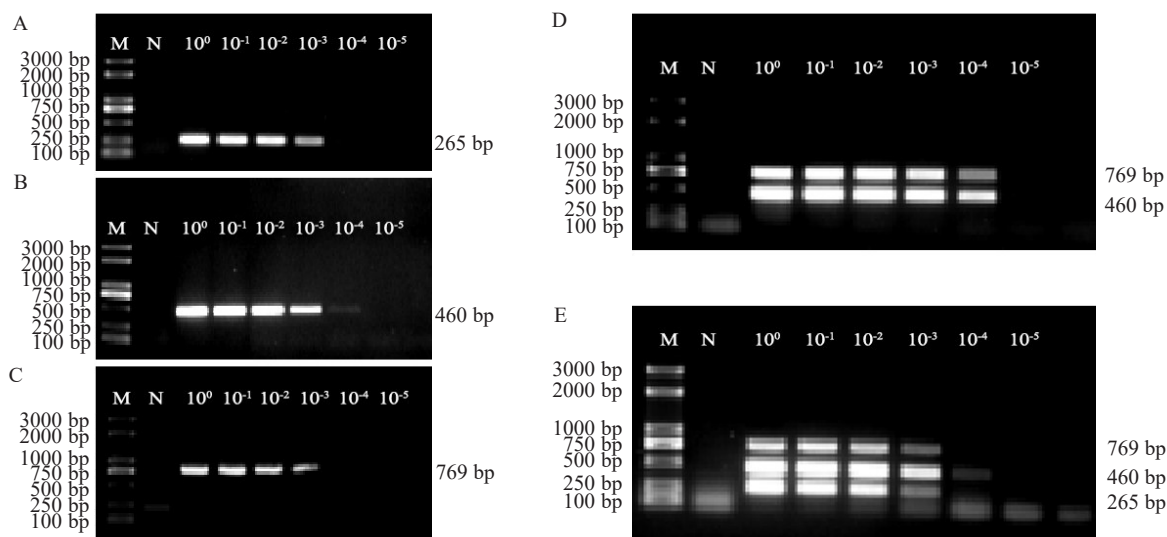


注:A 为 PMTV 阳性样品单重、双重及三重检测结果,M. 3000 bp Marker,N. 阴性对照,泳道 1~3 分别为 RNA1、RNA2、RNA3 引物的单重检测结果,泳道 4 为 RNA1+RNA2 引物的双重检测结果,泳道 5 为 RNA1+RNA3 引物的双重检测结果,泳道 6 为 RNA2+RNA3 引物的双重检测结果,泳道 7 为三重检测结果;B 为 PMTV 阳性样品 PVX、PVM、PVA 3 种病毒检测结果,M. 2000 bp Marker,泳道 1 为 PVX、PVM、PVA 三重阳性对照,泳道 2 为阴性对照,泳道 3 为 PMTV 阳性样品;C 为 PMTV 阳性样品 PVS、PVY、PLRV 3 种病毒检测结果,M. 2000 bp Marker,泳道 1 为 PVS、PVY、PLRV 三重阳性对照,泳道 2 为阴性对照,泳道 3 为 PMTV 阳性样品。

Note: A. Singleplex, duplex and triplex RT-PCR detection result of PMTV positive sample, M. 3000 bp Marker, N. negative control lanes 1-3, singleplex detection using primers for RNA1, RNA2, and RNA3, respectively; lane 4, duplex detection with RNA1+RNA2 primers; lane 5, duplex detection with RNA1+RNA3 primers; lane 6, duplex detection with RNA2+RNA3 primers; lane 7, triplex detection; B. PVX, PVM, PVA RT-PCR detection result of PMTV positive sample, M. 2000 bp Marker, lane 1 is the triplex positive control of PVX, PVM, and PVA, lane 2 is the negative control, and lane 3 is the PMTV positive sample; C. PVS, PVY, PLRV RT-PCR detection result of PMTV positive sample, M. 2000 bp Marker, lane 1 is the triplex positive control for PVS, PVY, and PLRV, lane 2 is the negative control, and lane 3 is the PMTV positive sample.

图2 马铃薯 PMTV 病毒三重 RT-PCR 检测体系凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PMTV triple RT-PCR detection system



注:A. 基于 PMTV 基因组 RNA1 的单重检测灵敏度分析;B. 基于 PMTV 基因组 RNA2 的单重检测灵敏度分析;C. 基于 PMTV 基因组 RNA3 的单重检测灵敏度分析;D. 基于 PMTV 基因组 RNA2+RNA3 的双重检测灵敏度分析;E. 基于 PMTV 基因组 RNA1+RNA2+RNA3 的三重检测灵敏度分析。A~E 中各泳道依次为 3000 bp Marker、阴性对照、PMTV 阳性样品 10^0 ~ 10^{-5} 稀释度。

Note: A. Sensitivity analysis for singleplex detection of PMTV RNA1; B. Sensitivity analysis for singleplex detection of PMTV RNA2; C. Sensitivity analysis for singleplex detection of PMTV RNA3; D. Sensitivity analysis for duplex detection of RNA2+RNA3; E. Sensitivity analysis for triplex detection of RNA1+RNA2+RNA3. Lanes A to E are, in order: 3000 bp marker, negative control, and PMTV positive samples at dilutions of 10^0 to 10^{-5} .

图3 不同稀释度灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity detection at different dilutions

(图 3-E) RT-PCR 法的检出限均为 10^{-3} 稀释度 ($0.1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), RNA2 引物(H360/C819)的 cDNA 在 10^{-4} 稀释度时仍可检测到微弱条带(图 3-B)。RNA2 引物(H360/C819)与 RNA3 引物(pmt3-S1/pmt3-A769)组成的双重体系(图 3-D)检出限为 10^{-4} 稀释度($0.01\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 灵敏度较高。

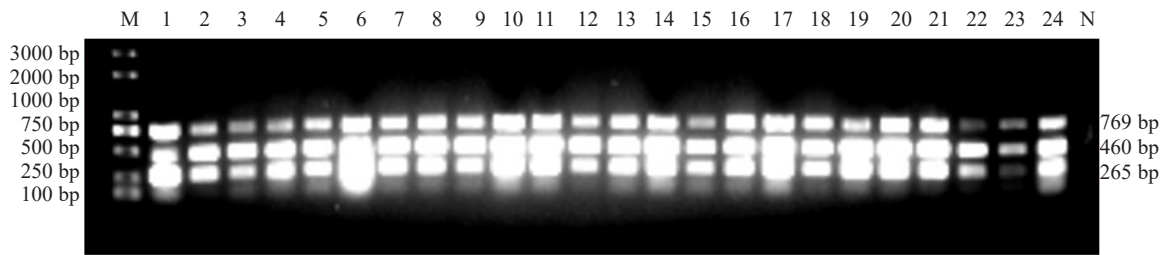
2.5 应用 RT-PCR 检测体系检测马铃薯田间样品

利用 PMTV 三重检测体系对采集自中国云南、广东、贵州、内蒙古、四川、河北等地的 200 余份马铃薯主产区的植株叶片、试管苗及块茎样品进行检测验证, 结果如图 4 所示, 共筛选出 24 份 PMTV 阳

性样品, 其中, 针对植株叶片和试管苗样品的 PCR 扩增效果较好, 扩增成功率均为 100%。块茎样品中的 2 份样品(泳道 22、23), 因 RNA1 或 RNA3 浓度过低导致对应的引物条带扩增效果欠佳。

2.6 阳性田间样品 PMTV 序列系统进化分析

从 24 份 PMTV 阳性样品中, 综合考虑来源地、序列相似度、多样性等因素, 最终选取 9 份有代表性的 PMTV 自然侵染的马铃薯块茎样品, 将扩增后得到的 PCR 产物送检测序, 分别得到 RNA1、RNA2 和 RNA3 三段产物序列。从 GenBank 数据库中下载 13 份已发布的 PMTV 序列(表 3), 采用 NJ 法构



注: 1~5 为植株叶片, 6~14 为试管苗, 15~24 为块茎。M. 3000 bp Marker, N. 阴性对照。
Note: 1-5 are plant leaves, 6-14 are tissue culture plants, and 15-24 are tubers. M. 3000 bp Marker, N. Negative control.

图 4 应用 PMTV 三重 RT-PCR 体系检测马铃薯田间样品

Fig. 4 Application of PMTV triplex RT-PCR system for potato field sample detection

表 3 已发布的 PMTV 分离株及本研究分离株来源

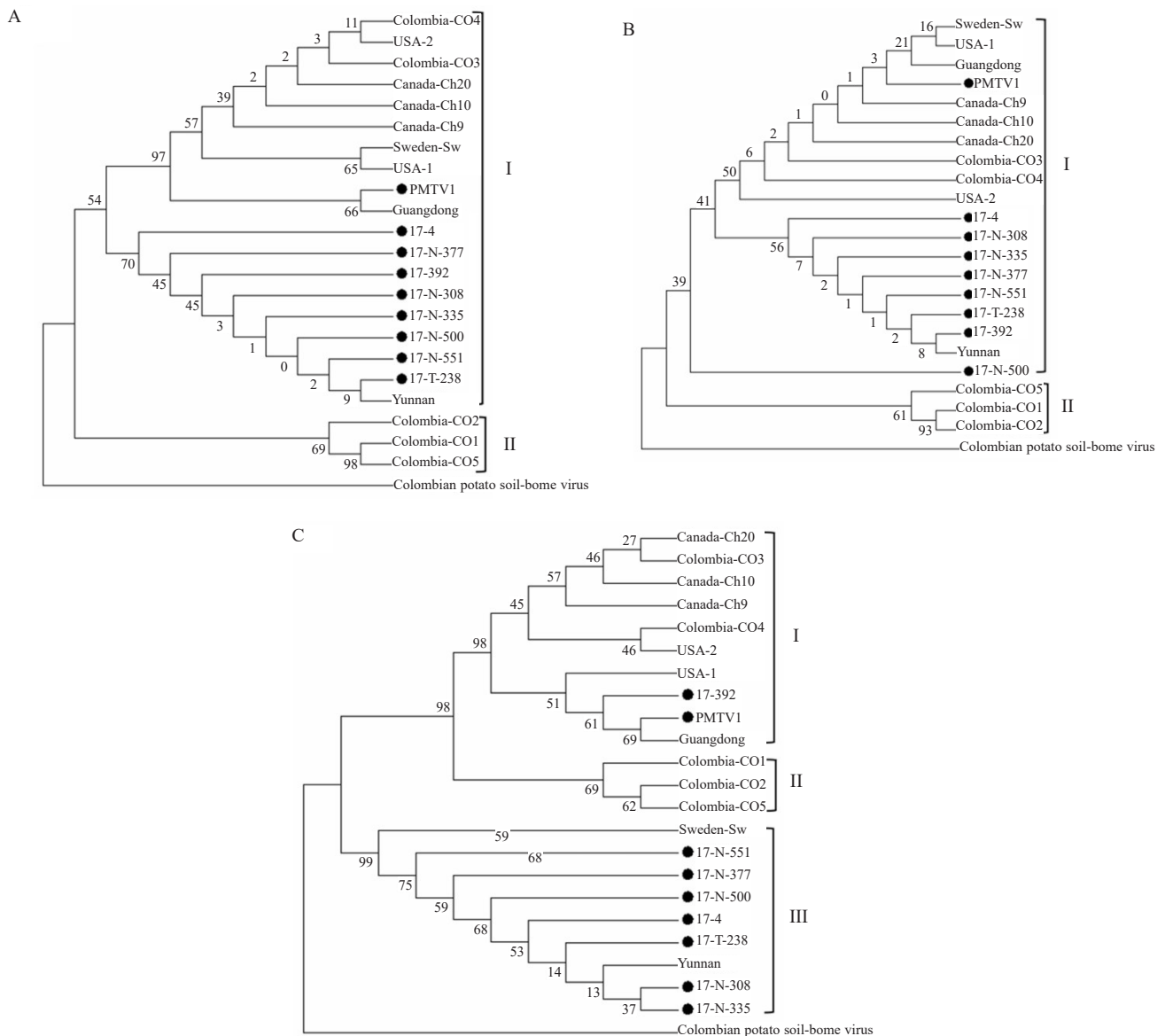
Table 3 Sources of published PMTV isolates and isolates from this study

序号 No.	分离株名称 Isolate name	来源 Origin	序列号 No.		
			RNA1	RNA2	RNA3
1	Guangdong	中国 China	KM822695.1	KM822699.1	KM822704.2
2	Canada-Ch20	加拿大 Canada	KM822698.1	KM822703.1	KM822708.1
3	Canada-Ch10	加拿大 Canada	KM822697.1	KM822702.1	KM822707.1
4	Canada-Ch9	加拿大 Canada	KM822709.1	KM822701.1	KM822706.1
5	Yunnan	中国 China	KM822696.1	KM822700.1	KM822705.1
6	Colombia-CO1	哥伦比亚 Colombia	KR857349.1	KR857350.1	KR857351.1
7	Colombia-CO2	哥伦比亚 Colombia	KR857352.1	KR857353.1	KR857354.1
8	Colombia-CO3	哥伦比亚 Colombia	KR857355.1	KR857356.1	KR857357.1
9	Colombia-CO4	哥伦比亚 Colombia	KR857358.1	KR857359.1	KR857360.1
10	Colombia-CO5	哥伦比亚 Colombia	KR857361.1	KR857362.1	KR857363.1
11	Sweden-Sw	瑞典 Sweden	AJ238607.1	AJ243719.1	AJ277556.1
12	USA-1	美国 USA	KP420026.1	KP420027.1	KP420028.1
13	USA-2	美国 USA	KY275269.1	KY284863.1	KY284862.1
14	PMTV1	中国内蒙古 Inner Mongolia, China			
15	17-4	中国贵州 Guizhou, China			
16	17-392	中国河北 Hebei, China			
17	17-N-308	中国云南 Yunnan, China			
18	17-N-335	中国云南 Yunnan, China			
19	17-N-377	中国云南 Yunnan, China			
20	17-N-500	中国云南 Yunnan, China			
21	17-N-551	中国云南 Yunnan, China			
22	17-T-238	中国云南 Yunnan, China			

建 RNA1、RNA2 以及 RNA3 的系统进化树(图 5)。

由图 5-A~B 可知,基于 RNA1 和 RNA2 分别构建的系统发育树的拓扑结构高度一致,均将供试分离株划分为两个主要进化支(I 和 II)。其中,来自哥伦比亚的 3 个参考分离株(Colombia-CO1、Colombia-CO2、Colombia-CO5)在 2 个系统发育树中均独立聚为一支(II),而本研究所涉及的全部分离株则与其他地理来源的参考分离株共同聚类于进化支 I,提示本研究分离株与哥伦比亚参考分离株在进化关

系上存在明显分化。RNA3 的系统发育分析(图 5-C)进一步揭示了 3 个进化分支:进化支 I 包含本研究的内蒙古分离株 PMTV1、河北分离株 17-392 以及我国广东参考分离株 Guangdong,显示出我国不同地区部分分离株之间的遗传同质性;进化支 II 同样仅含 3 个哥伦比亚分离株,与 RNA1 和 RNA2 树的聚类结果相吻合;进化支 III 则包含了瑞典 Sweden-Sw 参考分离株、Yunnan(云南)参考分离株以及本研究所获得的 6 个云南分离株和 1 个贵州分离株



注:A~C 分别为本研究中 PMTV RNA1、RNA2、RNA3 的 3 段目的基因序列基于 DJ 法构建的系统进化树。分支上的数字表示 1000 次自展重复的百分支持率。黑色圆点表示本研究中涉及的分离株的位置。进化树的根与哥伦比亚马铃薯土传病毒同为马铃薯帚顶病毒属。

Note: A-C show adjacency phylogenetic trees are constructed with 3 target nucleotide sequences of PMTV RNA1, RNA2, and RNA3 in this study respectively. The number on the branch represents the percentage support rate for 1000 self expanding repetitions. The black dots indicate the positions of the isolates involved in this study. Trees are rooted with Colombian potato soil-borne virus (CPSbV) of the genus *Pomovirus*.

图 5 PMTV 分离株 NJ 系统进化树
Fig. 5 NJ phylogenetic tree of PMTV isolates

(17-4),其中云南分离株(17-T-238、17-N-308、17-N-335)与贵州分离株(17-4)进一步聚为亚支,显示出一定的地理相关性。上述结果表明,PMTV不同基因组片段在进化上既存在一致性,也存在谱系分化。

3 讨论与结论

在植物病毒检测技术研究中,检测体系的灵敏度是衡量体系实用性与可靠性的关键指标。Zhou等^[20]通过采用RT-PCR方法对PMTV进行检测,结果表明该方法的检测灵敏度仅为 $5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。本研究所建立的三重RT-PCR检测体系cDNA检出限可达 10^{-3} 稀释度($0.1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。此外,相较于Xu等^[17]仅针对PMTV基因组RNA2中的CP基因构建的检测体系,本检测体系可同时靶向PMTV的三个RNA片段,显著提升了检测的准确性与可靠性,避免了因病毒分布不均导致的漏检问题。同时,3对引物融合到单管的反应设计也减少了试剂消耗与试验时间,适用于大规模样本筛查,尤其是在马铃薯种薯生产与脱毒苗早期检测中具有重要应用价值。尽管本体系在多数样本中表现良好,但在部分块茎样本中,由于RNA1或RNA3浓度较低,引物扩增效果不理想。这可能与病毒在块茎组织中分布不均或降解有关。未来可通过优化RNA提取方法或采用荧光定量PCR进一步提高对低浓度样本的检测能力。

此外,利用本体系对200份来自我国多地区的马铃薯样本进行检测,共发现24份PMTV阳性样本,阳性率为12%。2016年Hu等^[18]通过RT-PCR和ELISA在广东省首次报道了PMTV的侵染,本研究也在广东省筛查到了PMTV,与上述报道一致。同时,本研究在内蒙古自治区也发现了PMTV,但秦亚南^[21]对内蒙古自治区6个县的系统性筛查中未检出PMTV,提示在种薯调运与检疫中应加强对PMTV的监测。同时,基于RNA1、RNA2和RNA3的3段目的基因序列构建的系统进化树显示,我国PMTV分离株在进化上存在不同分支,其中本研究普查到的内蒙古与河北分离株与广东参考分离株亲缘较近,而本研究的云南与贵州分离株则与瑞典及我国云南参考分离株聚为一支。此结果与刘野等^[22]的研究结论基本一致,印证了PMTV在我国可能存在多来源引入或本地演化现象。这种地理分布与遗传结构的相关性,进一步支持了病毒通过种薯或土壤传

播的复杂性。因此,本检测体系可为追溯PMTV病毒传播路径、评估其局部适应性提供分子依据。

本研究成功建立了一种灵敏度高、特异性强、操作简便的三重RT-PCR检测体系,适用于PMTV潜伏期或低浓度感染样本的检测,并能兼容叶片、试管苗和块茎等多种组织类型。该体系通过同时检测3种RNA片段,有效避免了因病毒分布不均造成的漏检,在种薯生产及脱毒苗早期检测中具有重要应用价值。我国PMTV分离株存在多个进化分支,提示可能具有多源引入或本地演化特征。本检测体系为我国马铃薯PMTV的分子监测与防控策略制定提供了可靠工具。

参考文献

- [1] 庞泽,田国奎,王海艳,等.我国马铃薯产业发展现状及展望[J].中国瓜菜,2023,36(7):148-154.
- [2] 李明福.马铃薯病毒及其检疫重要性初析[J].植物检疫,1997,11(5):6-9.
- [3] Abbas A, Madadi M. A review paper on potato mop-top virus (PMTV): Occurrence, properties and management[J]. World Journal of Biology and Biotechnology, 2016, 1(3): 127-132.
- [4] Carnegie S F, Davey T, Saddler G S. Effect of temperature on the transmission of potato mop-top virus from seed tuber and by its vector, *Spongospora subterranea*[J]. Plant Pathology, 2010, 59(1): 22-30.
- [5] Andersen A B, Mogens N, Steen L N. Alternative hosts for potato mop-top virus, genus pomovirus and its vector *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*[J]. European Potato Journal, 2002, 45(1): 37-43.
- [6] 杨雯,何成勇,姜继红,等.我国马铃薯顶病毒的分子检测[J].植物保护学报,2019,46(6):1371-1372.
- [7] Tenorio J, Franco Y, Chuquillanqui C, et al. Reaction of potato varieties to potato mop-top virus infection in the Andes[J]. American Journal of Potato Research, 2006, 83(5): 423-431.
- [8] Nielsen S L, Igaard J P M. Incidence, appearance and development of potato mop-top türovirus-induced spraing in potato cultivars and the influence on yield, distribution in Denmark and detection of the virus in tubers by ELISA[J]. Potato Research, 1997, 40(1): 101-110.
- [9] Savenkov E I, Anna G, Zamyatnin A, et al. Potato mop-top virus: The coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*[J]. The Journal of General Virology, 2003, 84(4): 1001-1005.
- [10] Koenig R, Commandeur S, Loss S, et al. Beet soil-borne virus RNA 2: Similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses[J]. Journal of General Virology, 1997, 78(2): 469.
- [11] Reavy B, Cowan G H, Arif M. Association of sequences in the coat protein/readthrough domain of Potato mop-top virus with

- transmission by *Spongospora subterranea*[J]. Journal of General Virology, 1998, 79(10):2343.
- [12] Cowan G H, Roberts A G, Jones S, et al. Potato mop-top virus co-opts the stress sensor HIP26 for long-distance movement[J]. Plant Physiology, 2018, 176(3):2052-2070.
- [13] 孙现超, 赵文军, 青玲, 等. 大麦条纹花叶病毒中国株三基因盒(TGB)序列对比分析[J]. 植物病理学报, 2010, 40(4):433-437.
- [14] Ryabov E V, Robinson D J, Taliansky M E. A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4):1212-1217.
- [15] Kalyandurg P, Gil J F, Lukhovitskaya N I, et al. Molecular and pathobiological characterization of 61 potato mop-top virus full-length cDNAs reveals great variability of the virus in the centre of potato domestication, novel genotypes and evidence for recombination[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(6):864-877.
- [16] 丁小兰, 赵竹, 马占鸿, 等. 马铃薯帚顶病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2014, 28(5):59-64.
- [17] Xu H, Dehaan T L, Deboer S H. Detection and confirmation of potato mop-top virus in potatoes produced in the United States and Canada[J]. Plant Disease, 2004, 88(4):363-367.
- [18] Hu X X, Dickison V, Lei Y, et al. Molecular characterization of Potato mop-top virus isolates from China and Canada and development of RT-PCR differentiation of two sequence variant groups[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2016 (38):231-242.
- [19] 张威, 白艳菊, 文景芝, 等. 马铃薯六种主要病毒通用 RT-PCR 检测体系的建立[J]. 中国马铃薯, 2015, 29(4):222-227.
- [20] Zhou H L, Lei Y, Wang P, et al. Development of SYBR green real-time PCR and nested RT-PCR for the detection of potato mop-top virus (PMTV) and viral surveys in progeny tubers derived from PMTV infected potato tubers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2019(47):101438.
- [21] 秦亚南. 呼和浩特周边地区马铃薯病毒病的田间调查及分子鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2018.
- [22] 刘野, 高艳玲, 刘佳慧, 等. 马铃薯帚顶病毒基因组克隆与侵染性克隆构建[J]. 中国马铃薯, 2022, 36(4):322-331.