

辣椒番茄斑萎病毒荧光定量检测方法的建立

陈灵芝¹, 余海涛², 蒋晶晶²

(1. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所 兰州 730070)

摘要: 番茄斑萎病毒对辣椒生产造成了严重的危害, 为快速、准确检测该病毒, 基于甘肃省辣椒病样上发现的番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)基因组序列设计特异性引物, 建立了检测 TSWV 的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法(RT-qPCR), 并对此检测方法的特异性、灵敏度和重复性进行了评估。结果表明, 质粒标准品在 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度区间内 Ct 值与模板浓度的对数呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2=0.9978$, 标准曲线方程为 $y=-3.3537x+34.667$ 。建立的荧光定量 PCR 方法能特异性地检测 TSWV, 最低检测限为 11.9 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 是普通 PCR 灵敏度的 100 倍; 重复间变异系数为 0.19%~2.67%, 表明该方法重复性良好。利用 RT-qPCR 对田间采集的 15 份辣椒叶片样品进行 TSWV 检测, 结合植株病症, 确定辣椒植株显现 TSWV 症状的病毒载量阈值为 10^3 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。本研究结果可实现番茄斑萎病毒的快速检测, 为辣椒 TSWV 的风险评估和种植管理提供科学依据。

关键词: 辣椒; 番茄斑萎病毒; 荧光定量体系

中图分类号: S641.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)09-219-07

Establishment of real-time PCR detection method for tomato spotted wilt virus in pepper

Chen Lingzhi¹, Yu Haitao², Jiang Jingjing²

(1. Institute of Vegetables, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China; 2. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: Tomato spotted wilt virus (TSWV) has caused severe damage to pepper. To detect this virus rapidly and accurately, this study developed a SYBR Green I-based Real-Time Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) assay targeting the complete cds sequence of Tomato spotted wilt virus in pepper in Gansu province, and the sensitivity, specificity, and stability of this method were tested. The results showed that the Ct value had a good linear relationship with the logarithm of the copy number of the standard concentration, while the recombinant plasmid containing TSWV genome sequence were in the range of the plasmid standard of $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, and the correlation coefficient R^2 was 0.9978, the standard curve was $y=-3.3537x+34.667$. This established RT-qPCR specifically could detect TSWV with high specificity, the least detection limit was 11.9 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, which was 100 times more sensitive than conventional PCR. The coefficient of variation between groups was 0.19%-2.67%, indicating that the method was of good repeatability. Using RT-qPCR to detect TSWV in 15 pepper leaf samples collected from the field, and in combination with plant symptoms, a viral load threshold of 10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ was proposed for pepper plants exhibiting TSWV symptoms. The findings of this study enable rapid detection of TSWV in pepper, providing a scientific basis for risk assessment and crop management of TSWV in pepper production.

Key words: Pepper; Tomato spotted wilt virus; Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

番茄斑萎病毒((tomato spotted wilt virus, TSWV))属于布尼亚病毒目(Bunyavirales)番茄斑萎病毒科(Tospoviridae)正番茄斑萎病毒属(*Orthotospovirus*), 其寄主范围广, 据不完全统计,

TSWV 至少可侵害 160 种双子叶植物与 10 多种单子叶植物, 因其危害严重, 在世界十大重要植物病毒排名中居第 2 位^[1-2]。番茄斑萎病毒侵染辣椒可导致植株矮化, 叶片失绿、斑驳, 果实表面产生黄色

收稿日期: 2026-03-06; 修回日期: 2026-07-13

基金项目: 甘肃省科技厅东西部协作项目(26CXNA047); 甘肃省农业科学院生物育种项目(2024GAAS26); 甘肃省农业科学院重点研发项目(2024GAAS19); 甘肃省科技厅重大专项(24ZDNA005)

作者简介: 陈灵芝, 女, 研究员, 主要从事辣椒新品种选育研究。E-mail: gschlzh38@sina.com

或褐色环斑,果实畸形、成熟不均,易脱落,商品性差,使种植户遭受重大经济损失^[3-10]。番茄斑萎病毒作为危害辣椒的重要病毒病,具有发病隐匿、田间发病快等特点,难以早期监测,对于病毒载量和症状之间的关系,目前文献报道的较少。当植株出现明显症状时,常规防控措施效果差^[11],因此,建立早期精准检测技术对该病害防控至关重要。

目前针对番茄斑萎病毒的检测主要有血清学、分子生物学、生物学和电镜观察等方法^[12]。血清学方法一般采用双抗体夹心酶联免疫试剂盒(DAS-ELISA)和快速试纸条检测,分子生物学方法有逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和基于RT-PCR技术原理的双启动寡核苷酸技术(DPO)^[13]、依赖核酸序列的扩增技术(NASBA)^[14]、逆转录-重组酶聚合酶扩增技术(RT-RPA)^[15]等。RT-PCR较血清学方法灵敏,但只能定性不能定量,对于病毒含量较少的样品,检测效果不佳^[16]。实时荧光定量RT-qPCR(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction)具有全封闭扩增、灵敏度高、重复性好、特异性强、可定量检测、检测效率高、耗时短、可视化等特点,且SYBR Green I荧光染料法摒弃价格高昂的探针,降低了试验成本,简化了操作过程,成为近年来病原检测的主流方法之一^[17-18]。

本研究拟建立一种基于SYBR Green I的荧光定量PCR检测法,研究病毒载量和症状之间的关系,为辣椒TSWV的早期诊断和发病风险的早期预警提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2024年10月至2025年1月在北京市农林科学院农业农村部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室进行。用于质粒构建的番茄斑萎病毒(TSWV)及用于特异性检验的烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV),均来源于甘肃省农业科学院植物保护研究所保存的接种辣椒叶片。2024年9月从甘肃省农业科学院蔬菜研究所兰州试验地发病田采集具有典型TSWV性状的(6份)、疑似发病的(4份)、完全健康的(5份)辣椒叶片样品共15份,用于研究RT-qPCR的精确性及TSWV病毒载量与发病症状之间的关系。

主要试剂:RNA提取试剂盒为天根生化科技有限公司的多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(RNA-

prep Pure Plant Plus Kit, DP441)。反转录试剂盒为天根生化科技有限公司的反转录试剂盒(TIAN-Script II RT Kit, KR107)。DNA聚合酶为天根生化科技有限公司的TaqDNA聚合酶(ET101-02-01)。胶回收试剂盒为生工生物工程(上海)股份有限公司的EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (B610353-0100)。PLB克隆试剂盒为天根生化科技有限公司的PLB零背景快速克隆试剂盒(Lerhal Based Simple Fast Cloning Kit, VT206)。PLB质粒提取试剂盒为宝生物技术(北京)有限公司的TaKaRa MiniBest Plasmid Purification Ki(9760)。本试验使用的荧光试剂来自翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产的Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)(11201ES03)。大肠杆菌*Escherichiacoli*感受态细胞TOP10,购自北京全式金生物科技有限公司。质粒和大肠杆菌培养基为LB液体(固体)培养基,根据试验要求添加相应的抗生素。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA制备 使用RNAprep Pure Plant Plus Kit提取经液氮速冻后的接种TSWV、TMV、CMV的辣椒叶片总RNA, -80℃保存;根据反转录试剂盒TIANScript II RT Kit说明书进行反转录,分别获得TSWV、TMV、CMV的cDNA。

1.2.2 引物设计与合成 依据TSWV基因组序列(GenBank登录号:MK628739),利用软件Primer 6.0分别设计RT-PCR和RT-qPCR引物。RT-PCR引物序列TSWV-PLBF: ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGG, TSWV-PLBR: TCAAGCAAGTTCTGCGAGTTTTG, 扩增片段长度为777 bp。RT-qPCR引物序列:TSWV-qPCRF: CTGTGAGGCTTGCCATAAT, TSWV-qPCRR: CTAAGGCTTCCCTGGTGTC, 扩增片段长度为155 bp。使用T100 PCR基因扩增仪(美国伯乐公司)进行RT-PCR扩增,使用CFX96实时荧光定量PCR仪(美国伯乐公司)进行RT-qPCR扩增。

1.2.3 pLB质粒标准品的制备 以获得的TSWV的cDNA为模板,利用TSWV-PLBF/TSWV-PLBR特异性扩增TSWV,用1%琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,对扩增产物进行凝胶回收,将回收产物连接到pLB质粒载体(pLB-simple Vector)上,转化大肠杆菌菌株TOP10构建重组质粒。涂板培养后挑取8个菌落进行菌落PCR,对菌落PCR扩增片段长度正确的菌液送去测序,将测序正确的单菌落扩

繁后提取质粒,使用赛默飞 Nanodrop One 分光光度计(赛默飞世尔科技公司)检测质粒浓度,选择 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的重组质粒作为标准品并计算标准品质粒拷贝数^[17]。质粒拷贝数(拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)=(质粒浓度 $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$)/(660 道尔顿/碱基对 $\times$ 碱基对数)。最终测得标准质粒浓度为 1.19×10^{11} 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.4 标准曲线的建立 取 1 μL 质粒浓度为 1.19×10^{11} 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的标准质粒,加入 999 μL ddH₂O,获得 1.19×10^8 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 重组质粒标准品;将 1.19×10^8 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的质粒标准品以 10 倍梯度连续稀释 8 次,获得 $1.19 \times 10^1 \sim 1.19 \times 10^8$ 不同浓度的质粒 DNA 样品,ddH₂O 作为空白对照,进行 RT-qPCR。荧光定量反应体系为 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 5.0 μL ,上游和下游引物各 0.4 μL ,DNA 模板 1.0 μL ,加 RNase-Free H₂O 至 10.0 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,39 个循环;溶解曲线 65 $^{\circ}\text{C}$ to 95 $^{\circ}\text{C}$,递增 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。以质粒浓度除以 1.19 后的对数值为横坐标,以循环阈值(Ct 值)为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.5 RT-qPCR 特异性分析 分别以 TSWV、TMV、CMV 病毒 cDNA 为模板,ddH₂O 作为阴性对照,每个样品 3 个重复,利用上述 1.2.4 中的 RT-qPCR 体系进行检测,验证该方法的特异性。

1.2.6 荧光定量灵敏度试验 分别以 10 倍梯度稀释的 TSWV 质粒(浓度为 $1.19 \times 10^1 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)为模板,利用 RT-PCR 和 RT-qPCR 进行灵敏度检测。

1.2.7 RT-qPCR 重复性分析 以浓度为 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 质粒为模板,每个浓度设置 3 个复孔进行 RT-qPCR 检测。对不同模板浓度的

RT-qPCR 的 Ct 值进行统计学分析,计算变异系数,根据检测结果评估该方法的重复性。

1.2.8 田间样品检测 对田间采集的 15 份辣椒叶片样品 cDNA 及接种 TMV、CMV 病毒 cDNA 各 1 份,分别采用 RT-PCR 和 RT-qPCR 方法进行 TSWV 检测。利用建立的 RT-qPCR 标准曲线方程计算样品中的病毒载量,对样品的 TSWV 症状和病毒载量进行分析。

1.3 数据分析

采用 Excel 2021 进行数据分析和绘制 RT-qPCR 标准曲线。

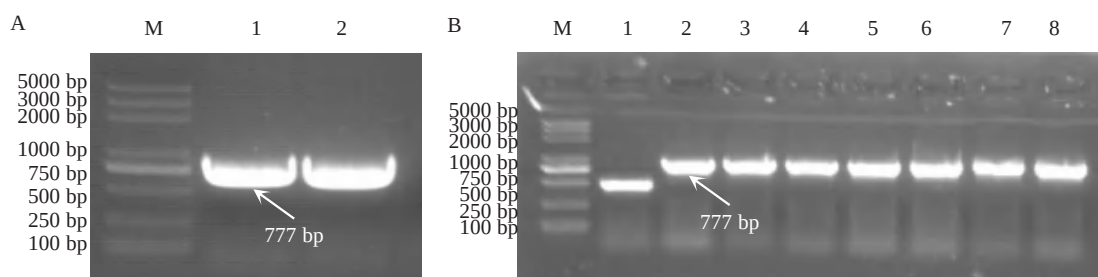
2 结果与分析

2.1 TSWV 基因的扩增和质粒标准品的制备

使用引物 TSWV- PLBF/TSWV- PLBR,对 TSWV 的基因进行扩增,结果如图 1-A 所示,成功获得了 TSWV 病毒基因的扩增产物,长度为 777 bp。对扩增产物进行凝胶回收并连接到 pLB 质粒载体上,转化大肠杆菌菌株 TOP10 后涂板培养。挑取 8 个菌落进行菌落 PCR,结果如图 1-B 所示,1 号泳道扩增片段长度小于 777 bp,为假阳性扩增。2~8 号泳道扩增片段长度与预期大小相符,为阳性扩增。将 2、3 号质粒菌液进行测序,经核苷酸序列比对后,确认为构建成功的重组质粒。对重组质粒进行扩繁后提取质粒,最终测得标准质粒浓度为 1.19×10^{11} 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 RT-qPCR 标准曲线建立

以重组质粒标准品 $1.19 \times 10^1 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 为模板,利用引物 TSWV-qPCR/TSWV-qP-CRR 进行 RT-qPCR,RT-qPCR 标准曲线如图 2 所示。对浓度范围为 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$



注:A. TSWV 目的片段 PCR 扩增;M. D2000 plus Marker;1~2. 扩增的 TSWV 目的片段。B. TSWV 菌液 PCR;1. 假阳性扩增;2~8. 阳性扩增;M. D2000 plus Marker。

Note: A. Amplified TSWV target fragment; M. D2000 plus Marker; 1-2. Amplified TSWV target fragment. B. TSWV bacterial liquid PCR amplification; 1. False-positive amplification in PCR; 2-8. Positive amplification in PCR; M. D2000 plus Marker.

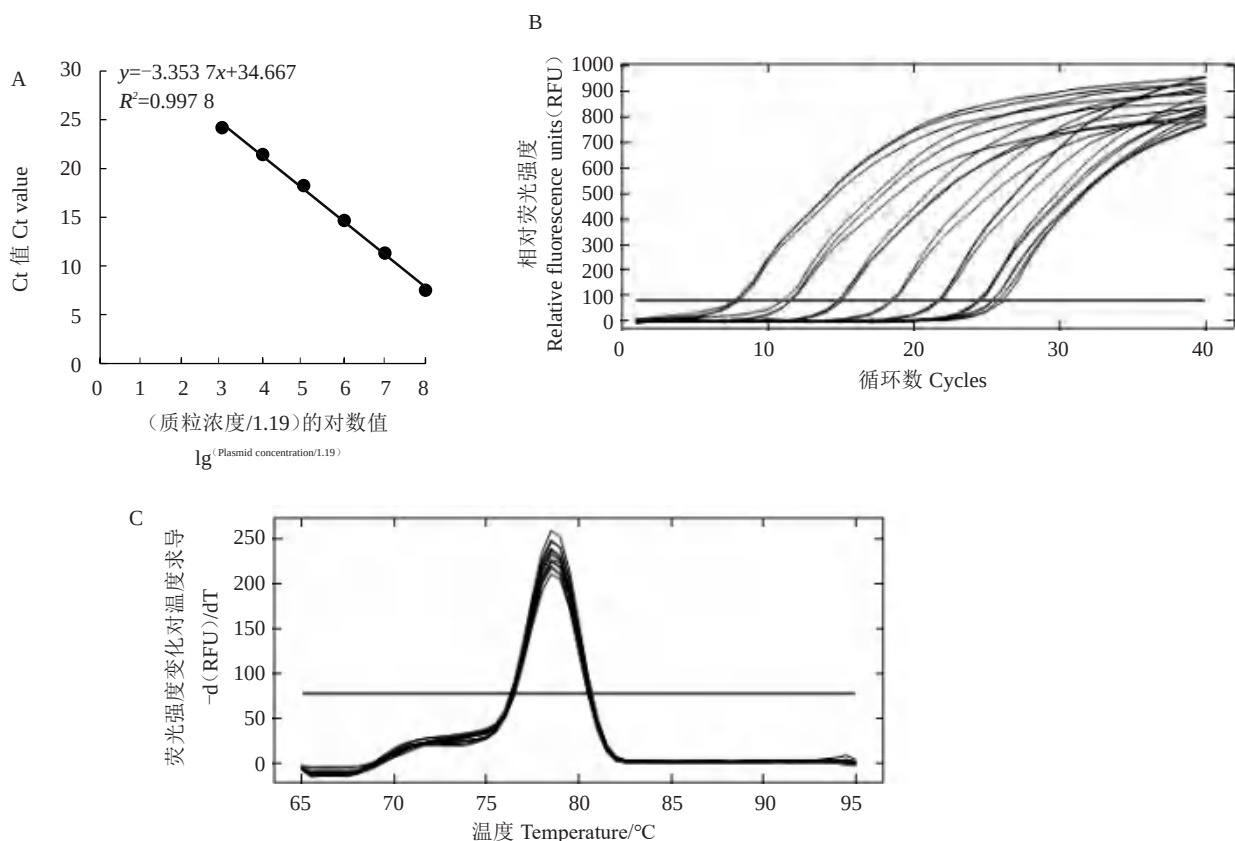
图1 TSWV 目的片段 PCR 扩增和菌液 PCR 扩增

Fig. 1 Amplified TSWV target fragment and bacterial liquid PCR amplification

的标准品进行分析,结果表明,Ct 值与质粒浓度的对数呈良好的线性关系,相关系数 $R^2=0.9978$,标准曲线方程为 $y=-3.3537x+34.667$ (图 2-A)。扩增曲线如图 2-B 所示。观察熔解曲线,均呈现出单一的峰形,且峰值对应的温度为 78.5°C ,表明引物具备良好的特异性(图 2-C)。

2.3 RT-qPCR 引物特异性试验

分别以 TSWV、TMV、CMV 病毒的 cDNA 为模板,并以 ddH₂O 作为阴性对照进行 RT-qPCR 扩增,结果如图 3 所示。TSWV 病毒 cDNA 呈现出特异性扩增曲线,TMV、CMV 病毒 cDNA 以及 ddH₂O 均未出现扩增信号。



注:A 为标准曲线,分别由拷贝数为 1.19×10^8 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ TSWV 质粒标准品经 10 倍梯度稀释而构建;B 为扩增曲线,从左到右分别由 1.19×10^8 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ TSWV 质粒标准品经 10 倍梯度稀释而构建;C 为熔解曲线,其峰值对应的温度为 78.5°C 。

Note: A is standard curve, built with a 10-fold serial dilution of TSWV plasmid DNA of 1.19×10^8 Copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ constructed respectively. B is amplification curve, from left to right were developed with a 10-fold serial dilution of TSWV plasmid DNA (starting at 1.19×10^8 Copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$); C is melting curve, and its peak corresponds to 78.5°C .

图 2 靶向 TSWV 病毒的 RT-qPCR 标准曲线的建立

Fig. 2 Establishment of a standard curve for TSWV in RT-qPCR

2.4 荧光定量灵敏度试验

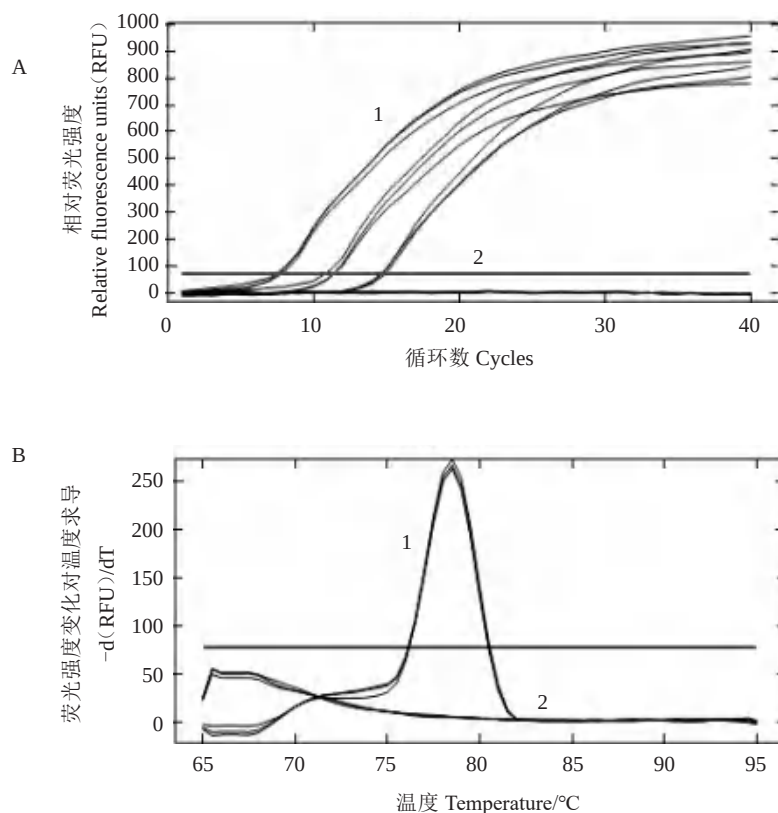
利用引物 TSWV-PLBF/TSWV-PLBR,对浓度范围在 $1.19 \times 10^1 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的样本进行 RT-PCR 扩增,结果如图 4-A 所示。在 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,RT-PCR 均能扩增出明亮清晰的条带,低于 1.19×10^3 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度,显示没有扩增条带,表明 RT-PCR 最低有效检测限为 1.19×10^3 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。使用 RT-qPCR 方法进行扩增,结果如图 4-B 所示,各浓度水平的质粒标准品扩增曲线均成功扩增,且均可检测到荧光信号,最低检测限为 11.9 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.5 RT-qPCR 重复性试验

以 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒为模板,采用 RT-qPCR 检测方法进行重复性试验,实施 3 次平行样本检测,根据不同浓度下的 RT-qPCR 的 Ct 值计算变异系数,结果如表 1 所示。 $1.19 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^8$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度下变异系数为 $0.19\% \sim 2.67\%$ 。

2.6 田间样品检测

2.6.1 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测 对采集的 15 份辣椒叶片样品的 cDNA 以及 1 份 TMV cDNA、1 份 CMV cDNA,分别用 RT-PCR 和 RT-qPCR 方法进行 TSWV 检测,RT-PCR 方法检测出阳性样品 6 份,阳

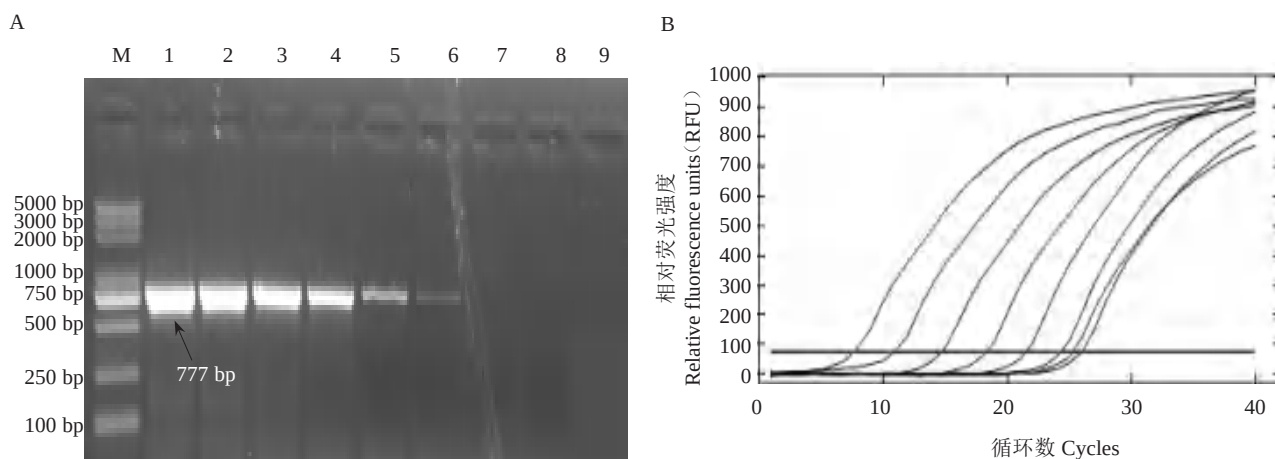


注:A 为扩增曲线;1.TSWV;2.TMV、CMV、ddH₂O。B 为熔解曲线;1.TSWV;2.TMV、CMV、ddH₂O。

Note: A is amplification curve; 1. TSWV; 2. TMV, CMV, ddH₂O. B is melting curve; 1. TSWV; 2. TMV, CMV, ddH₂O.

图 3 RT-qPCR 引物特异性验证

Fig. 3 Specificity verification of primer in RT-qPCR



注:A 为 TSWV 的 RT-PCR 试验结果, M. D2000 plus Marker; 1~8 分别为 $1.19 \times 10^8 \sim 1.19 \times 10^1$ 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 9 为 ddH₂O。B 为 TSWV 的 RT-qPCR 灵敏度试验结果, 从左到右分别是由 1.19×10^8 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 TSWV 质粒标准品经 10 倍梯度稀释而构建。

Note: A is sensitivity test results of RT-PCR detection of TSWV; M. D2000 plus Marker; 1-8 were amplified with a 10-fold serial dilution of TSWV plasmid DNA of 1.19×10^8 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ constructed respectively. 9 is negative control ddH₂O. B is sensitivity test results of RT-qPCR detection of TSWV, from left to right were developed with a 10-fold serial dilution of TSWV plasmid DNA of 1.19×10^8 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ constructed respectively.

图 4 TSWV 的荧光定量灵敏度试验

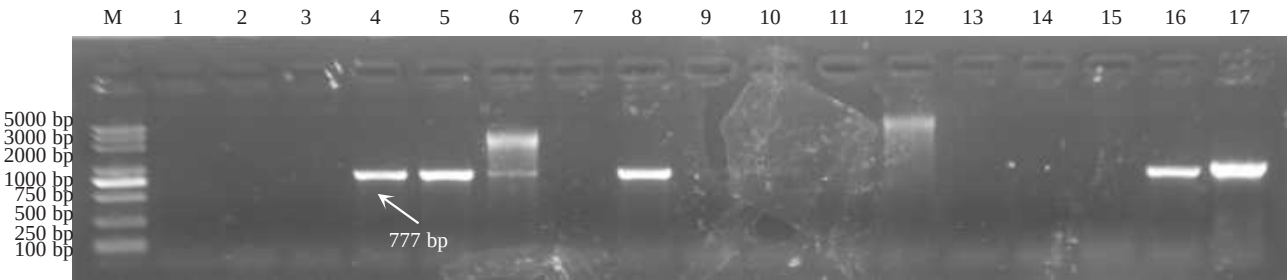
Fig. 4 Fluorescence quantitative sensitivity test for TSWV

表 1 TSWV 的 RT-qPCR 重复性检测
Table 1 RT-qPCR repeatability detection of TSWV

重组质粒标准品浓度 Recombinant plasmid concentration/ (Copies·μL ⁻¹)	Ct 值 Ct value	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient variation/%
1.19×10 ⁸	7.503	0.200	2.67
1.19×10 ⁷	11.305	0.021	0.19
1.19×10 ⁶	14.673	0.171	1.17
1.19×10 ⁵	18.230	0.079	0.43
1.19×10 ⁴	21.413	0.095	0.44
1.19×10 ³	24.203	0.097	0.40

性检出率为 35.3%。RT-qPCR 方法检测出阳性样品 8 份,阳性检出率为 47.1%。用 RT-qPCR 方法检出的其中 2 份阳性样品,用 RT-PCR 方法检测均呈阴性(图 5 中的 11 和 13 泳道),RT-qPCR 方法的阳性检出率比 RT-PCR 方法高 11.8%。

2.6.2 病毒载量和发病症状 对利用 RT-qPCR 检测出的 8 份阳性样品中 Ct 值和样品病症关联性进行分析,结果如表 2 所示,1 份样品植株表现为矮化、无叶片斑驳和失绿。Ct 值为 25.67,利用标准曲线方程 $y=-3.353\ 7x+34.667$ 换算出样品病毒载量约



注:M. D2000 plus Marker;1.TMV;2.CMV;4、5、6、8、16、17 为 TSWV 阳性样品。
Note: M. D2000 plus Marker; 1. TMV; 2. CMV;4, 5, 6, 8, 16, 17 were positive samples of TSWV.

图 5 田间样品 RT-PCR 检测结果

Fig. 5 Test results of RT-PCR detection of TSWV with samples from field

表 2 RT-qPCR 检测出的样品病毒载量和样品病症
Table 2 TSWV viral load of RT-qPCR and
symptom of sample

病毒载量 Viral load/ (Copies·μL ⁻¹)	Ct 值 Ct value	样品病症 Symptom of sample
10 ⁵	17.00	矮化,叶片斑驳,失绿 Stunt, leaf mottling and chlorosis
10 ⁴	19.62	叶片斑驳,失绿 Leaf mottling and chlorosis
10 ³	25.67	植株矮化,无叶片斑驳和失绿 Stunt, no leaf mottling and chlorosis

为 10³ 拷贝数·μL⁻¹。随着 Ct 值的减小,病毒载量逐渐增高,辣椒植株出现叶片斑驳和失绿等症状。

3 讨论与结论

利用 ELISA、RT-PCR 方法已在我国的广州、青海、四川、北京、云南、甘肃、贵州等大部分辣椒产区检测出了 TSWV,但利用 RT-qPCR 方法对 TSWV 进行定量检测的报道较少。许云玉等^[19]利用 RT-PCR 半定量法、RT-qPCR 相对定量法,对 TSWV 侵染的感病品种萧新 19 病毒积累量进行了检测,

表明只有当萧新 19 新叶的 TSWV 量积累到一定水平时,寄主才会显症。习凤妮^[20]研究表明利用 RT-qPCR 方法在感染 TSWV 的三生烟和本氏烟叶中最低可检测到的浓度为 100 拷贝数·μL⁻¹。本研究表明当辣椒叶片中 TSWV 病毒载量达到 10³ 拷贝数·μL⁻¹时,辣椒植株出现 TSWV 症状,且随着 TSWV 病毒载量增加,辣椒植株开始出现叶片斑驳和失绿等典型症状。

对田间采集的 15 份辣椒叶片样品,利用 RT-PCR 进行检测时,其中的 2 份样品不能扩增出 777 bp 的条带,但利用 RT-qPCR 方法检测时这 2 份样品呈阳性,说明 RT-qPCR 方法较 RT-PCR 方法灵敏,这也表明 RT-qPCR 方法可为辣椒 TSWV 的早期诊断和绿色防控提供更精准的检测。

病毒在植株上显症与否与植株生长环境、自身抗性强弱有关。笔者在田间观察到在整个生长季节里,同一辣椒品种中有零星植株 TSWV 发病,但其余植株均不发病,结合 RT-PCR 和 RT-qPCR 对 15 份田间样品检测结果,推测发生这种现象的原因并不是植株不带毒,而是植株 TSWV 病毒载量未达到病症显现的阈值,另一个原因可能是植株生长健

壮,抑制了病症。

基于在甘肃省发现的 TSWV 分离物的全基因组序列设计特异性引物,本研究建立了 TSWV 的 RT-qPCR 检测方法,此检测方法中,标准曲线中 Ct 值与质粒标准品浓度的对数呈良好的线性关系,熔解曲线峰值单一,该 RT-qPCR 检测法特异性好,能特异性地检测出 TSWV,不能检测出 TMV、CMV 病毒。灵敏度试验显示建立的 TSWV 的 RT-qPCR 方法的灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。重复试验结果变异系数均小于 3%,表明建立的 TSWV 的 RT-qPCR 方法具有良好的重复性。本研究建立的检测 TSWV 病毒的 RT-qPCR 方法具有特异性高、灵敏度高、重复性好等优点,能对 TSWV 病毒进行精准检测。

综上所述,本研究建立了基于 SYBR GreenI 的辣椒 TSWV 的 RT-qPCR 检测方法,提出了辣椒植株显现 TSWV 症状的病毒载量阈值为 10^3 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$,为 TSWV 的快速检测提供了技术支撑,也为辣椒 TSWV 的风险评估和种植管理提供了科学依据。

参考文献

- [1] Scholthof K G, Adkins S, Czosnek H, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 938-954.
- [2] 王昆, 张宝玺, 张正海, 等. 辣椒抗番茄斑萎病毒病研究进展及展望[J]. 中国蔬菜, 2019(12): 18-24.
- [3] Edward R P. A top ten list for economically important plant viruses[J]. Archives of Virology, 2015, 160(1): 17-20.
- [4] 黄娅, 罗信福, 曹刘素, 等. 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的 Dot-ELISA 检测[C]//中国植物保护学会. 2014 年中国植物保护学会学术年会论文集, 2014: 391.
- [5] 刘勇, 李媛媛, 吴竹妍, 等. 广州辣椒上番茄斑萎病毒属病毒的鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 383-384.
- [6] 韩帅, 张河庆, 吴婕, 等. 侵染四川辣椒的番茄斑萎病毒和辣椒轻斑驳病毒的小 RNA 测序检测及鉴定[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 147-154.
- [7] 吴淑华, 涂丽琴, 咸文荣, 等. 青海辣椒上番茄斑萎病毒检测及鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(7): 1391-1400.
- [8] 刘佳, 陈东亮, 梁玉镯, 等. 北京辣椒和番茄上番茄斑萎病毒的鉴定[J]. 植物检疫, 2021, 35(2): 44-48.
- [9] 桂敏, 高雪, 贾志强, 等. 云南辣椒正番茄斑萎病毒属病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 286-292.
- [10] 田雨, 李淳, 李岩, 等. 贵州辣椒番茄斑萎病毒的分子鉴定[J]. 中国蔬菜, 2023(2): 51-57.
- [11] 张家齐, 董丽红, 付一帆, 等. 草莓根腐病原足赤壳菌 Taq-Man 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 园艺学报, 2026, 53(3): 857-866.
- [12] 赵巍巍, 杨家强, 周小毛, 等. 番茄斑萎病毒 4 种检测方法比较[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 108-113.
- [13] 刘忠梅, 罗佳, 潘仲乐, 等. 应用 DPO 技术检测番茄斑萎病毒方法的建立[J]. 河南农业科学, 2017, 46(11): 93-97.
- [14] 吴兴海, 陈长法, 封立平, 等. 番茄斑萎病毒 NASBA 检测方法的建立[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 900-906.
- [15] 余辛, 魏梅生, 林晓红, 等. 番茄斑萎病毒 RT-RPA 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2020, 34(5): 46-49.
- [16] 王超敏, 何美丹, 王文治, 等. 甘蔗条点病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 126-133.
- [17] 郝文悦, 王锦锦, 葛建龙, 等. 唇形后口虫 SYBR GreenI 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 183-193.
- [18] 王慧荣, 刘艺, 刘文俊, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 gE 和 gB 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2025, 46(5): 74-79.
- [19] 许云玉, 贾志强, 高雪, 等. 番茄斑萎病毒侵染辣椒后病毒积累量动态变化[J]. 分子植物育种, 2023, 21(5): 1603-1609.
- [20] 习凤妮. 番茄斑萎病毒实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[D]. 长沙: 中南大学, 2013.