

网络出版时间:2017-07-21 14:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.09.015

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170721.1449.030.html>

3 种大白菜病毒多重 RT-PCR 检测技术的建立

刘欢¹, 李春游^{1,2}, 刘斐³, 郝兴安¹, 吴云锋¹

(1 西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 植物保护学院, 陕西杨凌 712100; 2 周至县农业技术推广中心, 陕西周至 710400; 3 咸阳市农业科学研究院, 陕西咸阳 712000)

【摘要】【目的】建立 3 种大白菜病毒多重 RT-PCR 检测技术, 为病毒病快速检测、白菜病毒病防治与抗病育种提供参考。【方法】针对我国大白菜芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)3 种病毒的外壳蛋白(CP)基因保守区序列, 设计特异性检测引物, 从多重 RT-PCR(mRT-PCR)扩增引物、Mg²⁺ 浓度、Taq DNA 聚合酶及 dNTPs 浓度、退火温度、延伸时间和循环次数等方面对 RT-PCR 检测技术进行优化。【结果】在 dNTPs 浓度为 0.24 mmol/L, Mg²⁺ 浓度为 2.8 mmol/L, Taq DNA 聚合酶浓度为 0.12 U/μL, 退火温度为 52 ℃, 延伸时间为 30 s, 循环 30 次, 即可成功地在一体系中对 TuMV、TMV 和 CMV 3 种病毒复合侵染的大白菜病样进行多重 RT-PCR 扩增, 扩增得到 228, 305 和 460 bp 3 条特异性条带, 其大小与试验设计相符合。灵敏度接近单重 RT-PCR(sRT-PCR), 体现了多重 RT-PCR 的优越性。【结论】建立了能同时检测大白菜样品中 TuMV、TMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 检测体系, 该多重 RT-PCR 方法能对田间大白菜样品进行 3 种病毒的准确、快速、高效检测。

【关键词】 大白菜; 芜菁花叶病毒; 烟草花叶病毒; 黄瓜花叶病毒; 多重 RT-PCR 检测

【中图分类号】 S436.341.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)09-0109-07

Simultaneous detection of three viruses infecting Chinese cabbage by multiplex RT-PCR

LIU Huan¹, LI Chunyou^{1,2}, LIU Fei³, HAO Xing'an¹, WU Yunfeng¹

(1 State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management of Ministry of Education, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Zhouzhi Agricultural Technology Extension Center, Zhouzhi, Shaanxi 710400, China; 3 Xianyang Agricultural Research Academy, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: 【Objective】Chinese cabbage virus diseases commonly occurred in China, causing serious yield losses. In order to quickly detection of these viruses and making foundation to disease control and breeding for disease resistance to guide the disease-resistant breeding. 【Method】A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (mRT-PCR) system was established for simultaneous detection of *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Chinese cabbage. Three sets of specific primers were designed according to the coat protein (CP) genes of the three viruses, respectively. The concentrations of the primers, Mg²⁺, Taq DNA polymerase and dNTPs were tested and the PCR conditions including annealing temperatures and amplification cycles were opti-

【收稿日期】 2016-07-08

【基金项目】 公益性行业(农业)专项“蔬菜主要病毒病防控技术研究与示范”(201303028); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

【作者简介】 刘欢(1990—), 男, 陕西周至人, 在读博士, 主要从事植物病毒检测方法和致病机理研究。

E-mail: 416424855@qq.com

【通信作者】 吴云锋(1960—), 男, 陕西乾县人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物病毒研究。E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

mized. 【Result】 Expected fragments of 228 bp (TuMV), 305 bp (TMV) and 460 bp (CMV) were amplified by this mRT-PCR system which dNTPs concentration was 0.24 mmol/L, Mg^{2+} concentration was 2.8 mmol/L, *Taq* DNA polymerase concentration 0.12 U/ μ L, annealing temperature was 52 °C, extension of time was 30 s and 30 cycles. With similar detection sensitivity to each single RT-PCR (sRT-PCR). 【Conclusion】 The mRT-PCR detection system for TuMV, TMV and CMV was successfully established. This system can accurately and quickly determine the infection of the three viruses from Chinese cabbage samples.

Key words: Chinese cabbage; *Turnip mosaic virus*; *Tobacco mosaic virus*; *Cucumber mosaic virus*; detection of multiplex RT-PCR

大白菜是我国最主要的蔬菜之一,在蔬菜产业中占有重要地位。农业部门的数据统计显示,2013年全国大白菜种植面积约为 290 万 hm^2 ,总产量达到 13 009 万 t。随着大白菜种植面积不断扩大,病毒病的危害逐年加重^[1]。对我国西北地区陕西省和甘肃省大白菜病毒病进行的调查发现,侵染大白菜的病毒有烟草花叶病毒 (TMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和芜菁花叶病毒 (TuMV),而且病毒经常发生复合侵染,直接影响大白菜的产量和品质。我国大白菜由于病毒病危害,平均每年造成 5% 的产量损失,有些年份减产 10% 以上,病毒病发生严重的地块几乎绝收^[2]。由于大白菜病毒病具有“多毒一症”的特点,生产上难以区分并及时采取防治措施。因此,针对大白菜病毒病的防控,急需建立可靠、快速、高效的检测方法,用以指导生产防治与抗病育种,同时也为病害的预测预报提供参考。

目前,大白菜病毒病的检测方法主要有 RT-PCR^[3-4]、血清学^[5]和 RT-LAMP^[6]3 类,RT-PCR 技术具有灵敏度高、特异性强的特点,克服了指示植物法、血清学检测法和电镜法周期长、价格高、灵敏度低的缺点^[7],现已广泛应用于植物病毒的检测^[8-9]。但传统单一 RT-PCR 每次只能检测一种病毒,若需要检测多种病毒,则需进行多次 PCR,操作繁琐,易污染。而多重 RT-PCR 可以同时检测多种病毒,试剂和时间消耗少,因而高效、快捷、经济,同时也保证了扩增结果的准确性,一定程度上加速了试验进程^[10],如王威麟等^[11]应用多重 RT-PCR 技术开展了 5 种西瓜病毒的检测研究;Tao 等^[12]利用多重 RT-PCR 技术检测了 7 种小麦病毒和植原体;Dai 等^[13]应用多重 RT-PCR 同时检测了 5 种烟草病毒。但截至目前,国内外尚未见大白菜病毒多重 RT-PCR 检测体系的报道。为此,本研究针对侵染大白菜的 TuMV、TMV 和 CMV 等 3 种病毒建立特异、高效的多重 RT-PCR 检测体系,以期快速检测大白菜病毒病原流行种类、指导抗病育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年 4 月从陕西扶风、周至、武功及甘肃秦州、麦积等地区采集大白菜病株样品,病株样品表现为叶片皱缩、花叶、局部坏死、褪绿等症状,每个地区采集 10 份样品,共计 50 份,将叶片保存于 -80 °C 冰箱备用。Marker 1,购自广州东盛生物科技有限公司;Biozol Extraction Reagent 试剂,购自 BioFlux 公司;M-MLV 反转录酶,购自 Promega 公司;*Taq* DNA 聚合酶,购自北京 MBI 公司;DNA 纯化回收试剂盒,购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 大白菜叶片总 RNA 提取

称取 0.1 g 大白菜病叶,加液氮充分研磨,迅速转入到 1.5 mL 无 RNase 的 eppendorf 管中。总 RNA 的提取按照 Biozol Extraction Reagent 说明书进行,将提取的 RNA 于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3 引物的设计与筛选

根据 GenBank 登录的 TuMV、TMV 和 CMV 病毒 CP 基因序列,利用 MEGA 6 进行比对找出各自基因相对保守区域,应用 Primer Premier 5.0 软件设计这 3 种病毒的特异性检测引物 mTMV-F/mTMV-R、mTuMV-F/mTuMV-R、mCMV-F/mCMV-R。由于多重 RT-PCR 要求在同一退火温度下扩增多个基因片段,因此需筛选出退火温度值较为一致的引物,最终确定的各引物序列见表 1。所有引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.4 单重 RT-PCR

用 M-MLV 反转录合成各病毒 cDNA 第一链。反应体系 25 μ L:总 RNA 5 μ L, DEPC H_2O 4 μ L, Random Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, 70 °C 变性 5 min,冰置 5 min;依次加入 DEPC H_2O 3.5 μ L, 5 $\times$ RT buffer 5 μ L, dNTPs (各 10 mmol/L) 5 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L 和 M-MLV 反转录酶 (200 U/ μ L) 1 μ L,短暂离心后,37 °C 金属浴

1 h,95 ℃灭活 10 min,— 20 ℃保存备用。

PCR 反应体系 25 μ L: ddH₂O 14.3 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L,dNTPs(2.5 mmol/L each) 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)0.2 μ L,模板 cDNA 2 μ L,正向和反向引

物混合物(10 μ mol/L each) 2 μ L。PCR 反应程序: 94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 30 次;最后 72 ℃终止补偿延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

表 1 多重 RT-PCR 检测的病毒特异性引物序列
Table 1 Virus-specific primers for multiplex PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')	引物长度/bp Length	退火温度/℃ T _m	产物大小/bp Product size	引物结合位点 Primer binding site
mCMV-F	AACCACCCAACCTTTGTAG	19	55	460	565~583
mCMV-R	GCTCGACGTCAACATGAA	18	56.6		1 007~1 024
mTMV-F	TGGAAACCTTCACCACAAG	19	57		157~175
mTMV-R	GTCCAGACCAAACCAGAAG	19	55.5	305	443~461
mTuMV-F	GTAACCAAGACCGACCATAC	20	54.5	228	9 342~9 361
mTuMV-R	TATGCCTCTCCGTGTTCT	18	54		9 552~9 569

注:引物结合位点分别以 GenBank 登录号 M22710、LN651240 和 AF169561 为参考。
Note:Primer binding site subject to GenBank M22710,LN651240 and AF169561,respectively.

1.5 多重 RT-PCR

多重 RT-PCR 反应体系为:将 TMV、CMV、TuMV 3 种病毒的 RNA(TMV、CMV 和 TuMV 分离物均来自陕西周至县)等量混合后,取 9 μ L 加入 RT 反应管中,同时加入 Random Primer 1 μ L,其他条件与单重 RT-PCR 相同。PCR 过程中,Taq DNA 聚合酶设 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 和0.12 U/ μ L 6 个处理;dNTPs 浓度设 0.12,0.16,0.20,0.24,0.28 和 0.32 mmol/L 6 个处理;Mg²⁺ 浓度设 1.2,1.6,2.0,2.4,2.8 和 3.2 mmol/L 6 个处理;退火温度分别选择 48,50,52,54,56 和 58 ℃;延伸时间分别设 20,30,40,50,60 和 70 s;循环次数选择 20,25,30,35,40 和 45 个循环。然后分别在上述条件下进行多重 RT-PCR 优化。

1.6 PCR 产物测序

利用 DNA 纯化回收试剂盒对多重 RT-PCR 产物进行回收纯化,将回收产物与 pGEM-T Easy Vector 进行连接,采用 CaCl₂ 法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞,将连接体系转入大肠杆菌 JM109,阳性克隆采用菌液 PCR 进行鉴定筛选后,提取质粒送至上海桑尼测序公司测序。

1.7 RT-PCR 灵敏度测定

将各病毒 RNA 和混合 RNA 依次稀释 10¹~10⁶ 倍,分别利用单重 RT-PCR 和多重 RT-PCR 进行检测,确定该体系的灵敏度。

2 结果与分析

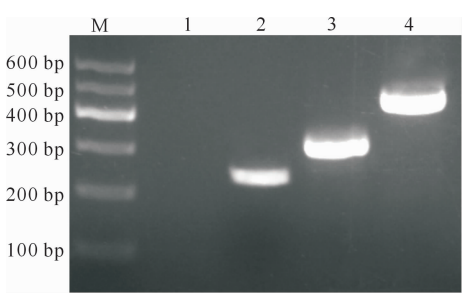
2.1 病毒总 RNA 提取质量检测

用 Biozol Extraction Reagent 试剂可以从大白

菜叶片上提取到高质量的 RNA,对 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,可见 28S 和 18S 2 条清晰的条带,且 28S 条带亮度高于 18S。提取 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8~2.0,RNA 质量浓度为 450~500 ng/ μ L,说明提取的 RNA 质量和纯度良好,可用于后续试验。

2.2 单重 RT-PCR 电泳检测

由图 1 可见,以 TuMV、TMV 和 CMV 3 种病毒 cDNA 为 PCR 反应模板,经 PCR 扩增分别得到大小为 228,305 和 460 bp 的 3 条特异性条带。



M. DNA Marker 1;1. 健康大白菜;
2~4. 依次为 TuMV、TMV、CMV
M. DNA Marker 1;1. Healthy Chinese cabbage;
2—4. TuMV, TMV, CMV, orderly

图 1 3 种大白菜病毒的单重 PCR 检测

Fig. 1 Single PCR detection of three Chinese cabbage viruses

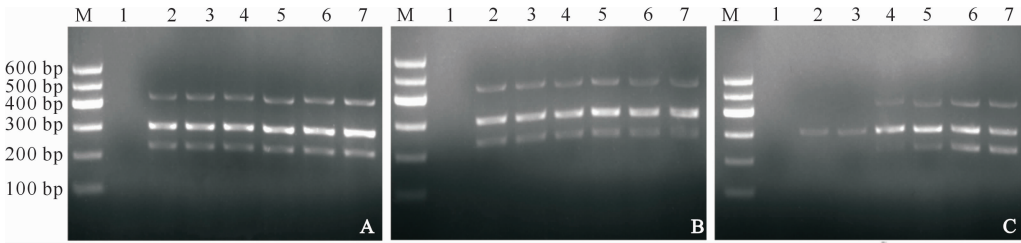
2.3 多重 RT-PCR 检测

2.3.1 引物浓度对扩增效果的影响 将 3 对引物等量加入多重 PCR 体系中,终浓度为 0.4 μ mol/L,退火温度 51 ℃,结果显示 TMV 和 CMV 条带清晰明亮,而 TuMV 条带亮度较弱。将 TMV 和 CMV 引物浓度降至 0.3 μ mol/L,保持 TuMV 引物浓度

不变,结果显示 TMV 和 CMV 条带亮度无明显变化,但 TuMV 条带亮度有所加强。优化后 3 对引物的浓度比为 TuMV : TMV : CMV =1.3 : 1 : 1。多重 PCR 要求在同一体系中同时扩增多个基因片段,引物之间相互竞争会影响 PCR 效果,因此各引物浓度非常关键,比例不当可能导致扩增效率差异较大,影响检测结果。

2.3.2 多重 RT-PCR 反应体系的优化 为摸索出经济、高效的反应体系,本研究依次对 *Taq* DNA 聚

合酶、dNTPs 和 Mg^{2+} 浓度进行优化。当 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.12 U/ μ L 时,3 条特异性条带最为清晰(图 2-A);在 dNTPs 浓度为 0.24 mmol/L 时,各条带亮度最优(图 2-B);当 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时,即可同时扩增出 3 条特异性条带,但 Mg^{2+} 浓度为 2.8 mmol/L 时各条带最清晰(图 2-C)。因此反应体系各参数最终确定为:*Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.12 U/ μ L,dNTPs 浓度为 0.24 mmol/L, Mg^{2+} 浓度为 2.8 mmol/L。



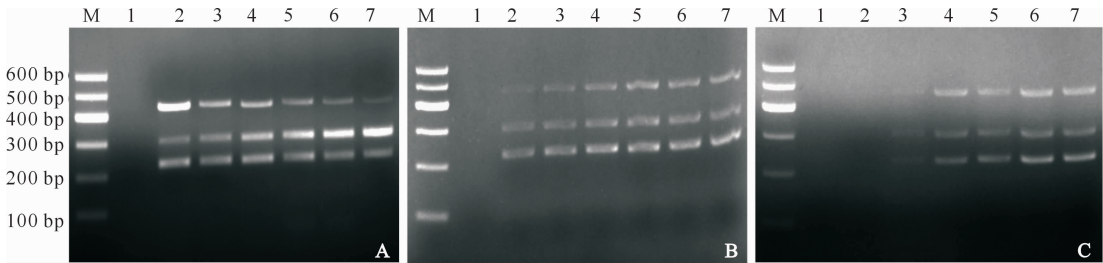
A. *Taq* DNA 聚合酶(1. 健康大白菜;2~7. 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 和 0.12 U/ μ L);B. dNTPs(1. 健康大白菜;2~7. 0.12,0.16,0.20,0.24,0.28 和 0.32 mmol/L);C. Mg^{2+} (1. 健康大白菜;2~7. 1.2,1.6,2.0,2.4,2.8 和 3.2 mmol/L);M. DNA Marker 1;
A. *Taq* DNA polymerase(1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 and 0.12 U/ μ L);B. dNTPs(1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 0.12,0.16,0.20,0.24,0.28 and 0.32 mmol/L);C. Mg^{2+} (1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 1.2,1.6,2.0,2.4,2.8 and 3.2 mmol/L);M. DNA Marker 1

图 2 反应体系参数对多重 RT-PCR 的影响

Fig. 2 Effects of the concentration of reaction components on multiplex RT-PCR

2.3.3 多重 RT-PCR 扩增条件的优化 对多重 RT-PCR 的退火温度、延伸时间和循环次数进行优化,结果显示:退火温度为 48 $^{\circ}$ C 时,CMV 条带很亮,但 TMV 和 TuMV 条带亮度较低;当退火温度为 58 $^{\circ}$ C 时,CMV 条带很亮,CMV 和 TuMV 条带亮度低;而在退火温度为 52 $^{\circ}$ C 时,各条带亮度均一、清晰(图 3-A)。延伸时间在 20~70 s 均能扩增出目标条

带,但超过 30 s 时各条带亮度无差别(图 3-B)。循环次数低于 25 时,几乎不出现目标条带,当循环次数高于 30 时均能扩增到 3 条特异性条带,且当循环次数为 30 时,各条带最为清晰(图 3-C)。因此,多重 RT-PCR 的扩增条件最终确定为:退火温度 52 $^{\circ}$ C,延伸时间 30 s,循环次数 30 次。



A. 退火温度(1. 健康大白菜;2~7. 48,50,52,54,56 和 58 $^{\circ}$ C);B. 延伸时间(1. 健康大白菜;2~7. 20,30,40,50,60 和 70 s);
C. 循环次数(1. 健康大白菜;2~7. 20,25,30,35,40 和 45 次);M. DNA Marker 1
A. Annealing temperature (1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 48,50,52,54,56 and 58 $^{\circ}$ C);B. Extension time (1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 20,30,40,50,60 and 70 s);C. Cycle numbers (1. Healthy Chinese cabbage;2~7. 20,25,30,35,40 and 45 cycles);M. DNA Marker 1

图 3 不同扩增条件对多重 RT-PCR 的影响

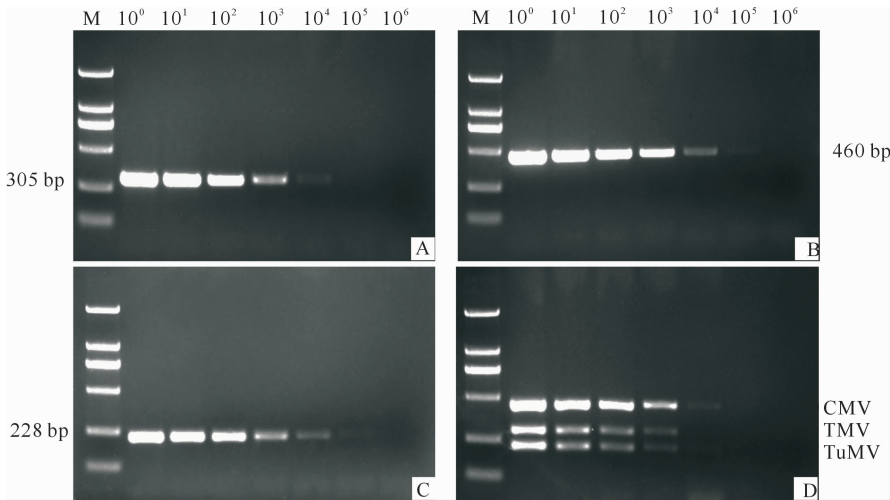
Fig. 3 Effects of different amplification parameters on multiplex RT-PCR

2.4 PCR 产物序列分析

用 DNA 纯化回收试剂盒回收多重 RT-PCR 扩增的 TuMV、TMV 和 CMV 条带,并与 pGEM-T

Easy Vector 进行连接,挑取阳性克隆,采用菌液 PCR 进行鉴定筛选后,提取质粒测序。测序结果表明:TuMV、TMV 和 CMV 扩增产物分别由 228,

305 和 460 个核苷酸组成,与设计的 PCR 产物大小相同。序列同源性分析结果表明,扩增得到的序列与参考序列的同源率分别达 100%,99.60%和 99.50%,从而保证了该多重 RT-PCR 检测体系的准确性。



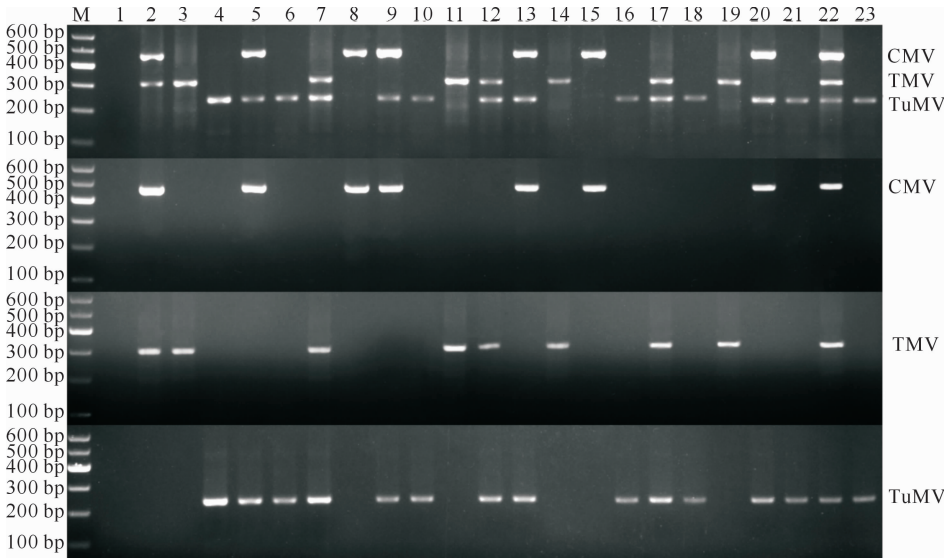
M. DNA Marker DL2000;10⁰~10⁶. 稀释倍数
M. DNA Marker DL2000;10⁰—10⁶. Dilution ratio
图 4 单重 RT-PCR 和多重 RT-PCR 检测灵敏度的测定
Fig. 4 The sensitivity of sRT-PCR and mRT-PCR

2.5 多重 RT-PCR 灵敏度测定

用 Biozol Extraction Reagent 提取得到的 RNA 质量浓度为 450~500 ng/ μ L。灵敏度测定结果显示,单重 RT-PCR 方法能检测出 TuMV、TMV 和 CMV 的最大 RNA 稀释倍数是 10⁵ 倍(图 4-A、B、C),最低 RNA 检测质量浓度为 5 pg/ μ L,优化后的多重 RT-PCR 检测灵敏度已经非常接近单重 RT-PCR(图 4-D)。

2.6 田间大白菜病样 TuMV、TMV 和 CMV 的检测

对 2015 年来自陕西周至、扶风、武功及甘肃秦州、麦积等地区的大白菜病毒病样品进行 TuMV、TMV 及 CMV 检测,RT-PCR 检测结果(图 5)显示:TuMV、TMV 和 CMV 在田间均有发生,多重 RT-PCR 和单重 RT-PCR 检测结果的正确率为 100%,充分证明了该多重 RT-PCR 检测的实用性和检测结果的准确性。



M. DNA Marker 1;1 健康大白菜;2~23. 感病大白菜
M. DNA Marker 1;1. Heathy Chinese cabbage;2—23. Infected Chinese cabbage
图 5 田间大白菜病毒样品单重和多重 RT-PCR 检测结果的比较
Fig. 5 Comparison of sPT-PCR and mRT-PCR detection for field Chinese cabbage viruses

3 讨 论

多重 RT-PCR 继承了单重 RT-PCR 反应的优点,能在一个 PCR 反应中同时扩增出多个核酸片段,节省了模板、时间和费用,在复合病毒检测方面具有显著优势,应用前景非常广阔。但多重 RT-PCR 要求在同一体系中进行多位点特异性扩增,是单重 RT-PCR 基础上的改进和完善,并不是单重 RT-PCR 的简单混合,需要反复试验,才能建立最适宜的反应体系和反应条件^[14-15]。本研究从影响多重 RT-PCR 的引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、dNTPs 浓度、退火温度等方面进行优化,结果发现 *Taq* DNA 聚合酶浓度和 dNTPs 浓度对多重 RT-PCR 影响较小,退火温度对多重 RT-PCR 有较大影响,设置不当会导致某些目标条带模糊或不出现。本试验利用 Primer Premier 5.0 对每种病毒设计了多对特异性检测引物,从中筛选出退火温度较为一致的检测引物,确保了同一退火温度下各引物能与模板正确结合。此外,引物的设计也是影响多重 RT-PCR 扩增效果的关键因素^[16-18],植物病毒 CP 基因具有高度保守性,针对 3 种病毒各自保守的 CP 基因序列设计引物,保证了 PCR 的特异性^[19]。

选择适当大小的 DNA 扩增片段也非常重要,多重 RT-PCR 结果会出现多个目标条带,为便于区分扩增产物的电泳条带,相邻条带之间应该有一定距离且要有指示条带作为参照。本研究指示条带选择 Marker 1(100, 200, 300, 400, 500, 600 bp),目标条带长度为 200~300 bp, 300~400 bp 和 400~500 bp,使得多重 PCR 结果一目了然,容易辨认特异性条带所对应的病毒。

本试验通过灵敏度测定发现,多重 RT-PCR 灵敏度非常接近单重 RT-PCR,分析原因可能是由于引物之间存在竞争性,也可能与引物的特异性有关,多重 RT-PCR 检测中引物所面对的是所有模板的竞争而不是只有一种^[20]。因此,其检测灵敏度较单重 RT-PCR 略有降低,但是检测结果完全在可信范围之内。

4 结 论

本研究对田间大白菜病毒种类进行了调查,发现侵染大白菜的主要病毒有 TuMV、TMV 和 CMV 3 种,因此建立了同时检测该 3 种大白菜病毒的多重 RT-PCR 体系,最终反应体系和参数为:dNTPs 浓度 0.24 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.8 mmol/L, *Taq*

DNA 聚合酶浓度 0.12 U/ μ L,退火温度 52 ℃,延伸时间 30 s,循环次数 30 次,在此条件下能在一个体系中同时检测到 TuMV、TMV 和 CMV 3 种病毒,且最低 RNA 检测的质量浓度为 5 pg/ μ L,检测灵敏度非常接近单重 RT-PCR,可应用于室内和田间大白菜病毒病复合侵染的同步检测,对生产实践和病害预测预报有重要意义。

[参考文献]

- [1] 张凤兰,李建伟.我国大白菜生产现状及发展对策[J].中国蔬菜,2011(3):1-2
Zhang F L, Li J W. The production situation and development countermeasures of celery cabbage in China [J]. China Vegetables, 2011(3):1-2.
- [2] 潘春清,张俊华,崔崇士,等.芜菁花叶病毒研究现状[J].东北农业大学学报,2008,39(1):129-133.
Pan C Q, Zhang J H, Cui C S, et al. Current study on the *Turnip mosaic virus* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(1):129-133.
- [3] 庄 木,王晓武,郑文光,等.十字花科蔬菜芜菁花叶病毒的 RT-PCR 快速检测[J].中国蔬菜,2002(5):10-11.
Zhuang M, Wang X W, Zheng W G, et al. Quick detection of TuMV in crucifer vegetable crops using RT-PCR [J]. China Vegetables, 2002(5):10-11.
- [4] 曾 钢,叶艳英,闫晓红,等.简化一步多重 RT-PCR 法快速检测芜菁花叶病毒[J].华北农学报,2012(3):102-107.
Zeng G, Ye Y Y, Yan X H, et al. Quick detection of *Turnip mosaic virus* by one-step multiple RT-PCR [J]. Agriculture Boreali-Sinica, 2012(3):102-107.
- [5] 周益军,侯庆树,程兆榜,等.油菜芜菁花叶病毒鉴定、提纯及血清学[J].江苏农业学报,1994(2):42-47.
Zhou Y J, Hou Q S, Cheng Z B, et al. Identification, purification and serology of *Turnip mosaic virus* from rape [J]. Jiangsu Journal of Agriculture Sciences, 1994(2):42-47.
- [6] Zhao L, Hao X, Liu H, et al. Rapid detection of *Turnip mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Phytopathology, 2014, 162(10):693-696.
- [7] Bertolini E, Olmos A, Martínez M C, et al. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees [J]. Journal of Virological Methods, 2001, 96(1):33-41.
- [8] 胡丹丹,顾金刚,姜瑞波,等.定量 RT-PCR 及其在植物学研究中的应用[J].植物营养与肥料学报,2007(3):520-525.
Hu D D, Gu J G, Jiang R B, et al. Quantitative RT-PCR and its application in botany research [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2007(3):520-525.
- [9] 金凤媚,薛 俊,郑艳红,等.半定量 RT-PCR 技术的研究及应用[J].天津农业科学,2008(1):10-13.
Jin F M, Xue J, Jia Y H, et al. Study and application of semi-quantitative RT-PCR technique [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2008(1):10-13.

- [10] 刘正斌,高庆荣,王瑞霞,等. 多重 PCR 技术在植物生物学研究中的应用 [J]. 分子植物育种,2005,3(2):261-268.
Liu Z B,Gao Q R,Wang R X,et al. Application of multiplex PCR to studies on plant biology [J]. Molecular Plant Breeding,2005,3(2):261-268.
- [11] 王威麟,张 昊,于祥泉,等. 侵染西瓜的 5 种病毒 ZYMV、WMV、TMV、SqMV 和 CMV 的多重 RT-PCR 检测体系的建立与检测应用 [J]. 植物病理学报,2010,41(2):27-32.
Wang W L,Zhang H,Yu X Q,et al. Establishment and application of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of five water melon viruses ZYMV, WMV, TMV, SqMV and CMV [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2011,41(2):27-32.
- [12] Tao Y,Man J Y,Wu Y F. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China [J]. Arch Virol,2012,157:1261-1267.
- [13] Dai J,Chen J L,Huang T,et al. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants [J]. Journal of Virological Methods,2012,183:57-62.
- [14] 陈明洁,方 倜,柯 涛,等. 多重 PCR:一种高效快速的分子生物学技术 [J]. 武汉理工大学学报,2005,27(10):37-40.
Chen M J,Fang T,Ke T,et al. Multiplex PCR: a molecular biotechnique of high efficiency and speed [J]. Journal of Wuhan University of Technology,2005,27(10):37-40.
- [15] Thompson J R,Wetzel S,Klerks M M,et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control [J]. Journal of Virological Methods,2003,111(2):85-93.
- [16] Deb M,Anderson J M. Development of a multiplexed PCR detection method for *Barley* and *Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus* [J]. Journal of Virological Methods,2008,148(1):17-24.
- [17] Menzel W,Jelkmann W,Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control [J]. Journal of Virological Methods,2002,99(1):81-92.
- [18] Periasamy M,Niazi F R,Malathi V G. Multiplex RT-PCR, a novel technique for the simultaneous detection of the DNA and RNA viruses causing rice tungro disease [J]. Journal of Virological Methods,2006,134(1):230-236.
- [19] Henegariu O,Heerema N A,Dlouhy S R,et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. Research Reports,1997,23:504-511.
- [20] Roy A,Fayad A,Barthe G,et al. A multiplex polymerase chain-reaction method for reliable sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees [J]. Journal of Virological Methods,2005,129:47-55.
- [29] Meng S X,Huang S. Improved calibration of nonlinear mixed-effects models demonstrated on a height growth function [J]. Forest Science,2009,55(3):238-248.
- [30] Calama R,Montero G. Multilevel linear mixed model for tree diameter increment in stone pine (*Pinus pinea*): a calibrating approach [J]. Silva Fennica,2005,39(1):37-54.
- [31] Nigh G. Calculating empirical best linear unbiased predictors (EBLUPs) for nonlinear mixed effects models in Excel/Solver [J]. Forestry Chronicle,2012,88(3):340-344.
- [32] 王亚南,王军辉,祁万宜,等. 华山松种源对树高生长模型参数的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(7):74-81.
Wang Y N,Wang J H,Qi W Y,et al. Effects of *Pinus armandi* Franch provenances on parameters of height-age model [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2015,43(7):74-81.
- [33] 符利勇,李永慈,李春明,等. 利用 2 种非线性混合效应模型(2 水平)对杉木林胸径生长量的分析 [J]. 林业科学,2012,48(5):36-43.
Fu L Y,Li Y C,Li C M,et al. Analysis of the basal area for Chinese fir plantation using two kinds of nonlinear mixed effects model(two levels) [J]. Scientia Silvae Sinicae,2012,48(5):36-43.
- [34] Zhao L,Li C,Tang S. Individual-tree diameter growth model for fir plantations based on multi-level linear mixed effects models across southeast China [J]. Journal of Forest Research,2012,18(4):305-315.

(上接第 102 页)