

# 西番莲 TeMV 和 CMV 双重 RT-PCR 检测体系的建立及应用

焦楠, 朱宁, 程春振, 林玉玲, 李汉生, 陈发兴, 赖钟雄\*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

**摘要:**【目的】建立西番莲夜来香花叶病毒(*Telosma mosaic virus*, TeMV)和黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的双重 RT-PCR 检测体系。【方法】根据 TeMV 和 CMV 的外壳蛋白(coat protein, CP)基因序列, 分别设计两对特异性引物, 并对引物组合浓度、退火温度和循环次数进行优化。【结果】优化结果显示: TeMV 和 CMV 最佳引物组合浓度分别为  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 最佳退火温度为  $57 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 最佳循环次数为 35 次。【结论】灵敏度分析结果显示, 在样品 cDNA 原液稀释到  $10^{-5}$  时, 仍能检测到两种病毒扩增出的目的条带。同时, 以健康组培苗作为对照组, 应用建立的双重 RT-PCR 检测技术对采集于福建省不同产地的 36 份西番莲样品进行了病毒检测, 发现有 8 份样品同时感染两种病毒, 8 份样品仅感染 TeMV, 10 份样品仅感染 CMV。本研究可为西番莲 TeMV 和 CMV 的检测提供便利。

**关键词:** 西番莲; 夜来香花叶病毒; 黄瓜花叶病毒; 病毒检测; 双重 RT-PCR 技术

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2019)07-0947-07

## Establishment and application of the *Telosma mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* Duplex RT-PCR System in passionfruit

JIAO Nan, ZHU Ning, CHENG Chunzhen, LIN Yuling, LI Hansheng, CHEN Faxing, LAI Zhongxiong\*  
(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** 【Objective】Passion fruit is rich in nutrition with unique flavor and more than 130 kinds of aromatic substances, covering most of the aroma in fruits. Passionfruit is an important raw material for juice making. At present, there are a large number of cultivated purple (*P. edulis*), yellow (*P. edulis* var. *flavicarpa*) and hybrid passionfruits in China. Passionfruit has been planted as a new fruit species in Fujian Province in recent years. However, severe passionfruit virus disease leads to tree decline as well as yield and quality decline, which seriously hinders the development of passionfruit industry. *Cucumber mosaic virus*, *East Asian Passiflora virus*, *Passionfruit mottle virus*, *Papaya leaf curl Guangdong virus*, *Euphorbia leaf curl virus* and *Telosma mosaic virus* have been found in China. Among them, *Cucumber mosaic virus* is the main infection virus. Therefore, it is of great significance to establish a rapid and efficient virus detection system for passionfruit. 【Methods】From June to September 2018, 34 samples of passionfruit leaf were collected from different areas of Fujian Province. The samples were frozen in liquid nitrogen and stored in  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  refrigerator. According to the conserved region of TeMV, CMV coat protein gene in NCBI database, a pair of specific primers for the two viruses were designed using Primer5.0 software. Extraction of total RNA from passionfruit leaves was carried out using Trizol Kit (TRANS) according to the instruction manual. Synthesis of cDNA was done using reverse transcription Kit (TaKaRa). With the cDNA from the reverse transcription as a template, TeMV and CMV specific primers were used for RT-PCR amplification. The amplified product was recovered and ligated to the

收稿日期: 2019-01-28

接受日期: 2019-04-29

基金项目: 福建省高原学科建设经费(102/71201801101); 福建农林大学水果产业乡村振兴服务团队项目(102/69914001003)

作者简介: 焦楠, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。Tel: 13159405066, E-mail: 1455799184@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: laizx01@163.com

pMD18-T vector, then transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . The positive clones were collected and sequenced after PCR detection. Based on single RT-PCR technology, the concentration of primer combination, annealing temperature and cycle times of Duplex RT-PCR system were optimized.【Results】The results of single RT-PCR amplification showed that when annealing temperature was 57 °C, the band specificity was strongest, and the specific band was brighter and clearer than other bands. Therefore, 57 °C was the best annealing temperature for TeMV and CMV. The nucleotide sequences of TeMV and CMV subjected to Blast alignment using NCBI database. The results showed that the amplified products were the partial sequences of TeMV and CMV of passionfruit. The optimization results of Duplex RT-PCR showed that the best primer combinations of TeMV and CMV were 2.0 mmol · L<sup>-1</sup> and 8.0 mmol · L<sup>-1</sup>, respectively with the optimum annealing temperature of 57 °C and the optimum cycle number of 35. The sensitivity analysis results showed that when the total RNA solution was diluted to 10<sup>-5</sup> the target bands amplified by the two viruses, 323 bp and 227 bp, could still be detected. Using healthy tissue culture seedlings as control group, 34 samples of passionfruit collected from different areas of Fujian Province were detected by using the established dual RT-PCR detection technique. Both TeMV and CMV could be detected at the same time.【Conclusion】In this study, a virus detection system for simultaneous detection of TeMV and CMV in passionfruit was established. When the optimized detection system is used to detect passionflower samples collected in the field, the detection effect is good. It provides technical support for rapid detection of passionflower virus diseases.

**Key words:** Passionflower; *Telosma mosaic virus*; *Cucumber mosaic virus*; Virus detection; Duplex RT-PCR

西番莲(*Passiflora caerulea* L.)也称百香果,是西番莲科(*Passiflora ceae*)西番莲属(*Passiflora* L.)的多年生常绿藤本植物,其果实营养丰富,味道鲜美,风味独特,有“饮料之王”的美誉,在国际饮料市场占有重要地位<sup>[1]</sup>。西番莲原产南美洲的巴西至阿根廷一带,我国主要分布在台湾、广东、福建、广西、浙江、四川等省区。目前我国大量栽培的有紫果西番莲(*P. edulis*)、黄果西番莲(*P. edulis* var. *flavicarpa*)及杂种西番莲<sup>[1]</sup>。其中,黄果西番莲因其具有适应性好、甜度高、酸度低以及营养价值更丰富等优点<sup>[2]</sup>,市场受欢迎度越来越高,近年来被福建省大力推广种植。然而,西番莲病毒病病害严重,导致西番莲种质退化,产量和品质下降,严重阻碍了我国乃至世界西番莲产业的发展<sup>[3]</sup>。我国西番莲病毒病最早发生在台湾地区,随后在福建、广东和海南等西番莲产区也陆续被发现<sup>[4]</sup>。在我国已发现的侵染西番莲的病毒病主要有黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、东亚西番莲病毒(*East Asian Passiflora virus*, EAPV)、西番莲斑驳病毒(*Passionfruit mottle virus*, PaMV)、广东番木瓜曲叶病毒(*Papaya leaf curl Guangdong virus*, PaLCuGdV)、大戟曲叶病毒(*Euphorbia leaf curl virus*, ELCV)和夜来香花叶病毒

(*Telosma mosaic virus*, TeMV)等<sup>[5-8]</sup>。其中,CMV为主要侵染病毒<sup>[4]</sup>。

近些年来各地区之间的苗木销售活动的日益频繁、带毒苗木扦插扩繁等使得病毒病害传播和蔓延日趋严重<sup>[3]</sup>,因此西番莲病毒病的防控迫在眉睫。准确检测和鉴定西番莲病毒是进行病毒病防控的前提,因此建立快速、高效的病毒检测体系意义重大。已报道的植物病毒检测方法主要有指示植物法<sup>[9]</sup>,电子显微镜检测法<sup>[9]</sup>、血清学检测法<sup>[3,10]</sup>和分子生物学检测法<sup>[5]</sup>等。其中,分子生物学检测法因其灵敏度高,特异性强等特点成为植物最常用的病毒检测方法<sup>[6]</sup>。

多重 RT-PCR(multiplex RT-PCR)可同时检测多种植物病毒,不仅具备传统 RT-PCR 灵敏度高特异性强的特点,而且可以大大提高检测效率,已经在百合<sup>[11]</sup>、柑橘<sup>[12]</sup>、烟草<sup>[13]</sup>、水仙<sup>[14]</sup>、甘薯<sup>[15]</sup>、番茄<sup>[16]</sup>、大蒜<sup>[17]</sup>、葡萄<sup>[18]</sup>、马铃薯<sup>[19]</sup>和桃<sup>[20]</sup>等植物上得到了广泛应用<sup>[21]</sup>。目前,针对西番莲病毒分子生物学检测方面的报道较少,未见有一次性检测多种西番莲病毒病的报道。前期调查中,笔者发现福建省西番莲检出率最高的病毒为 TeMV 和 CMV。笔者以此两种病毒为检测对象,根据它们的外壳蛋白(cp)基因序列设计了两对特异性检测引物,建立并优化双重 RT-

PCR检测方法,预期本研究可为西番莲田间病毒病的快速检测和后期病毒病防治及脱毒技术研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试TeMV、CMV毒源为2018年4—9月采自福建省不同产地的西番莲病叶样品(共34份,其中采于福州的病样2份,采于泉州的病样8份,采于福清的病样18份,采于漳州的病样6份)。采集的34份病叶样品发病症状不同,主要表现为斑驳花叶、叶

片皱缩、卷叶、环斑花叶、果实木质化等病毒病的症状。阴性对照样品2份,为经单一RT-PCR检测呈现阴性的健康组培苗叶片。以上36份西番莲样品均经液氮处理后置于-80℃冰箱保存。

### 1.2 引物设计

根据NCBI数据库中已登录TeMV、CMV外壳蛋白基因序列的保守区域,利用Primer5.0软件设计两种病毒的特异性引物各一对,引物设计原则上保证各引物扩增产物的片段长度大小有差异,退火温度相似,引物设计后经Blast比对保证其特异性,由福州尚亚生物技术有限公司进行合成(表1)。

表1 实验用引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物长度 Primer length/bp	目标片段长度 Target fragment size/bp
TeMV-F	ACCCTCTCAAGCCAATGGTT	20	323
TeMV-R	AGTGTGCCTTTCAGTGCCT	20	
CMV-F	TGTGGGTGACAGTCCGTA	20	227
CMV-R	CGTCTCAAGTGCATCGTCTT	20	

### 1.3 总RNA的提取及cDNA的合成

采用Trizol试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),参照说明书提取西番莲叶片总RNA。利用Thermo超微量核酸检测仪测定RNA的浓度和纯度。使用Prime Script™ RT-PCR Kit反转录试剂盒(大连TaKaRa宝生物公司)合成cDNA,具体步骤参照说明书。

### 1.4 单一RT-PCR扩增

以1.3中反转录得到的cDNA为模板,采用TeMV、CMV特异性引物进行RT-PCR扩增,PCR扩增体系为:cDNA模板1μL;上、下游引物各1μL;Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) 12.5μL;加ddH<sub>2</sub>O至25μL。RT-PCR循环条件为:94℃预变性3min;94℃变性30s;设置5个退火温度:52、55、58、61、64℃,退火30s;72℃延伸35s,35个循环;最后72℃延伸10min,4℃保存。PCR扩增结束后进行1%的凝胶电泳验证。采用Easy Pure Quick Gel Extraction Kit(北京全式金生物技术有限公司)回收目的片段,连接至pMD18-T载体(大连TaKaRa宝生物公司)后转化至大肠杆菌感受态DH5α(北京全式金生物技术有限公司),经菌液PCR检测后挑选阳性克隆子送至铂尚生物公司进行测序验证。

### 1.5 双重RT-PCR扩增

以复合感染TeMV和CMV的西番莲病叶样品

cDNA为模板,适量稀释后进行双重RT-PCR扩增。对该体系的引物浓度,退火温度,循环次数进行梯度设置(表2),优化双重RT-PCR体系。PCR扩增产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳。

表2 双重RT-PCR体系参数优化

Table 2 Optimization of duplex RT-PCR system parameters

优化参数 Optimization parameters	参数设置 Parameter setting
引物浓度组合比 Primer concentration combination ratio	1:1, 3:1, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 1:3
退火温度 Annealing temperatures/℃	56, 57, 58, 59, 60, 61, 62
循环次数 Cycle index	20, 25, 30, 35, 40

### 1.6 灵敏度检测

根据优化的双重RT-PCR体系对西番莲样品进行灵敏度检测,将复合感染TeMV、CMV的西番莲病叶样品的cDNA原液按10倍梯度进行稀释,依次稀释cDNA原液浓度为10<sup>0</sup>~10<sup>-6</sup>。随后进行双重RT-PCR扩增,用于灵敏度检测。

### 1.7 供试样品检测

采用优化后的双重RT-PCR检测体系,对采集于不同产地的36份西番莲样品进行检测,以健康组培苗叶片作为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 部分感病西番莲样品表型

在西番莲不同产区采集紫果西番莲和黄果西番

莲的感病样品,对其感病叶片和果实拍照记录。样叶病状主要表现为叶片斑驳、黄点、皱缩畸形、褪绿、黄化以及产生孔洞等(图1),果实出现畸形、皱缩、木质化等感病表型。



A. 部分紫果西番莲感病表型;B. 部分黄果西番莲感病表型;C. 感病样叶片局部放大图。

A. Phenotype of partially infected purple passionfruit; B. Phenotype of partially infected yellow passionfruit; C. Enlarged detail of the infected passionfruit.

图1 部分感病西番莲样叶表型

Fig. 1 Phenotype of passionfruit leaves infected with virus disease

### 2.2 RT-PCR 扩增

在退火温度设置为 51、54、57、60、63 °C 时, TeMV 和 CMV 均能扩增出大小分别为 323 bp 和 227 bp 的单一一条带,条带与目标片段大小相一致。在 TeMV 单一 RT-PCR 体系中,温度为 51、54、57 °C 时扩增出的条带均明亮且清晰,且在 57 °C 时条带最清晰,随着温度升高到 60、63 °C,条带变暗(图2)。

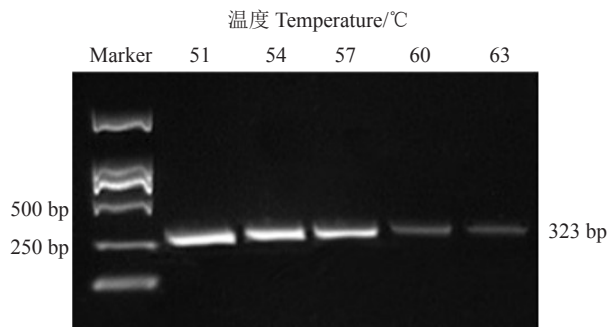


图2 不同退火温度下 TeMV 的单一 RT-PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of TeMV by single RT-PCR using different annealing temperatures

在 CMV 扩增体系中,退火温度为 57 °C 时得到的条带特异性最强,比其他条带更明亮清晰,其他温度扩增得到的条带均较暗,表明 57 °C 为 TeMV、CMV 的最佳退火温度(图3)。

将测序得到的 TeMV 和 CMV 核苷酸序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,序列分析结果显示,

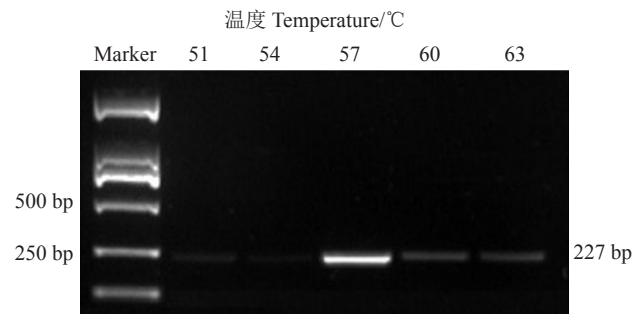


图3 不同退火温度下 CMV 的单一 RT-PCR 扩增

Fig. 3 Amplification of CMV by single RT-PCR using different annealing temperatures

TeMV 扩增产物与贵州分离物(MH623078.1)序列相似性为 98.37%, CMV 扩增产物与浙江分离物(MF580924.1)序列相似性为 98.77%,表明扩增产物为西番莲 TeMV 和 CMV 的部分序列(图4)。

### 2.3 双重 RT-PCR 扩增

2.3.1 双重 RT-PCR 体系的优化 在双重 RT-PCR 体系中,设置 TeMV 和 CMV 不同的引物浓度比进行扩增,结果如图5所示,当 TeMV 和 CMV 的引物浓度比设置为 1:1、3:1、3:2、4:1、2:3 时,只有 TeMV 能扩增出目的条带,CMV 未见条带。当引物浓度比为 1:4、1:3 时能同时扩增出 TeMV 和 CMV 目的条带,扩增效果较好。因此,选取 TeMV:CMV 浓度比 1:4(即 TeMV 反应终浓度为 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, CMV 终浓度为

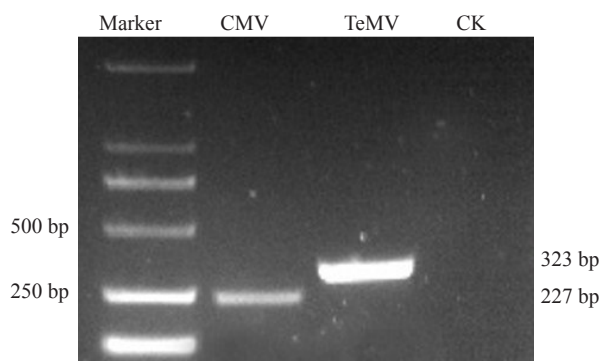


图4 TeMV和CMV单重RT-PCR扩增  
Fig. 4 Amplification of TeMV and CMV by a single RT-PCR

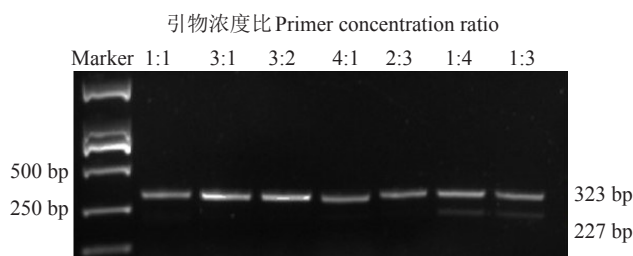


图5 不同引物浓度下TeMV和CMV的双重RT-PCR扩增  
Fig. 5 Amplification of TeMV and CMV by duplex RT-PCR using different concentrations of primers

8.0 mmol·L<sup>-1</sup>)为最佳引物浓度。

采用优化后的最佳引物浓度(TeMV 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, CMV 8.0 mmol·L<sup>-1</sup>)进行双重RT-PCR扩增,设置体系的退火温度为56~62℃,如图6所示,在退火温度为60~62℃时,扩增出的TeMV和CMV条带较暗,在56~59℃时,均能扩增出两条清晰的目的条带,在57℃时扩增效果较好,扩增得到的两条目的条带明亮清晰,分别为323 bp和227 bp,且未出现非特异性扩增产物,因此选取57℃为双重RT-PCR最佳退火温度。

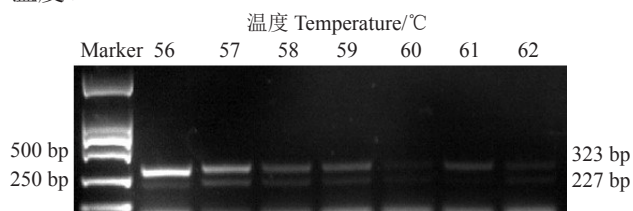


图6 不同退火温度下TeMV和CMV的双重RT-PCR扩增  
Fig. 6 Amplification of TeMV and CMV by duplex RT-PCR using different annealing temperatures

以优化后的最佳退火温度57℃和最佳引物浓度(TeMV 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, CMV 8.0 mmol·L<sup>-1</sup>)作为反应条件,对双重RT-PCR的循环次数进行优化。结果如图7所示,当循环次数为20次和25次时,未扩增出条带,当循环次数设置为35次和40次时,双重

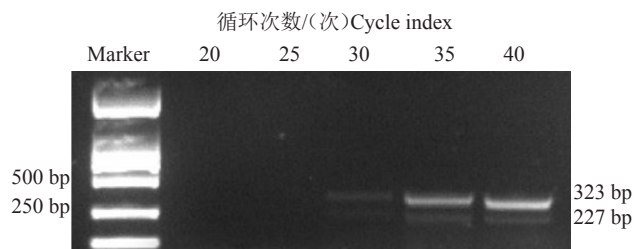


图7 不同循环次数下TeMV和CMV的双重RT-PCR扩增  
Fig. 7 Amplification of TeMV and CMV by duplex RT-PCR using different cycle index

RT-PCR体系扩增得到较好效果,均能扩增出两条目的条带;在循环次数为30次时,扩增所得条带模糊。据此,考虑到减少循环时间,最佳循环次数设置为35次。

2.3.2 灵敏度检测 将西番莲样叶中提取出的cDNA原液按10倍浓度梯度依次稀释,采用双重RT-PCR体系对稀释后的样叶cDNA进行TeMV和CMV的灵敏度检测。检测结果显示,在稀释到10<sup>-4</sup>时,扩增出的条带亮度开始变微弱,当样叶总cDNA稀释到原液的10<sup>-5</sup>时,仍可以扩增出特异性条带,检测灵敏度相当于10<sup>-5</sup> mg组织量(图8)。

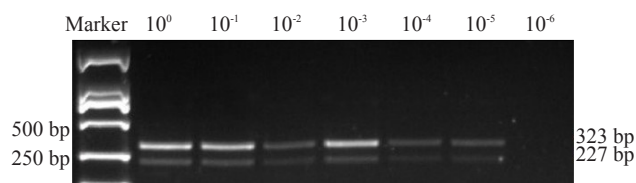


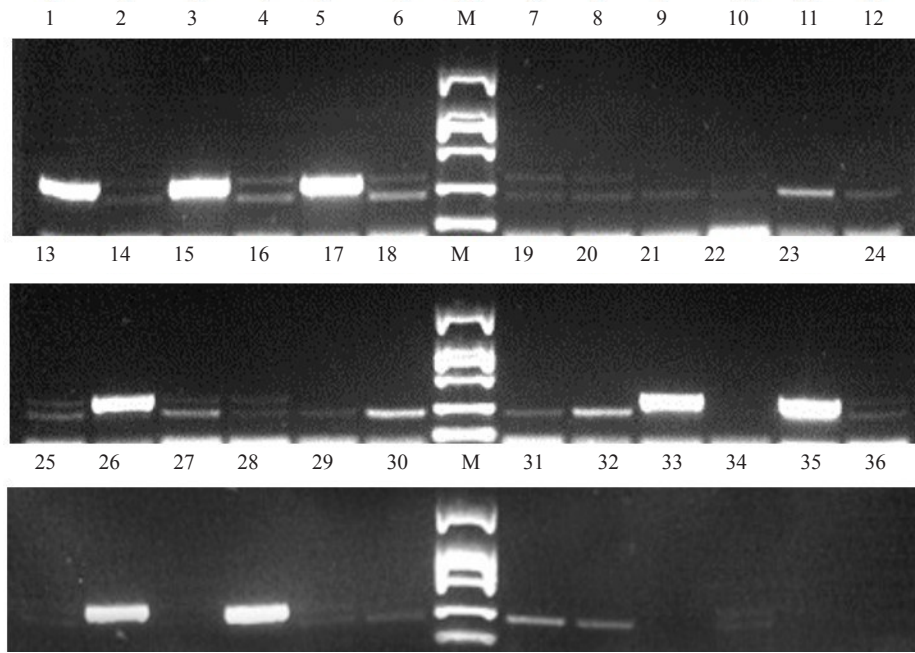
图8 双重RT-PCR扩增的灵敏度检测  
Fig. 8 Sensitivity detection of duplex RT-PCR

## 2.4 应用双重RT-PCR检测西番莲样品TeMV和CMV感染情况

将优化后的双重RT-PCR体系应用于36份西番莲样叶检测,结果表明(图9),来自不同产区的样品中,有8份样品检测出复合感染TeMV和CMV两种病毒,有8份样品单感TeMV,10份样品单感CMV,第35号和36号对照组组培苗均未检测出TeMV、CMV,检测结果与单一RT-PCR结果一致,证明建立的双重RT-PCR检测体系能够稳定、精确的检测出单感或双感TeMV、CMV的西番莲样品。

## 3 讨论

西番莲产业深受病毒病问题的困扰,迄今为止,国内外已发现侵染西番莲的植物病毒有26种<sup>[4]</sup>。培育西番莲无病毒母本树和苗木以及进行抗病品种的选育工作时,均需要进行病毒检测。RT-PCR检测方



M. Marker; 1~34. 依次采自福州、泉州、漳州、福清、闽侯的感病样叶; 35~36. 健康组培苗叶片。

M. Marker; 1-34. Infected leaves collected from Fuzhou, Quanzhou, Zhangzhou, Fuqing and Minhou; 35-36. Healthy tissue culture seedling leaves.

图9 不同产地西番莲样品双重 RT-PCR 病毒检测

Fig. 9 Detection of duplex RT-PCR virus in passionflower samples from different habitats

法具有较高的特异性和灵敏度,但是一次只能检测一种病毒,耗时较长,为解决该方法的局限性,多重 RT-PCR 技术在植物病毒检测方面得到大力的推广应用。樊荣辉等<sup>[22]</sup>利用多重 RT-PCR 技术一次性扩增出文心兰 CyMV、ORSV 和 BYMV 等病毒的特异性片段;范旭东等<sup>[23]</sup>运用多重 RT-PCR 技术建立了能同时检测葡萄 GLRaV-3、GRSPaV、GVB 和 GVA 的多重 RT-PCR 反应体系;丁芳等<sup>[12]</sup>建立了一种同时检测柑橘黄龙病病原类细菌(*Candida tus Liberibacter asiaticus*, HLB)、柑橘裂皮类病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)的多重 RT-PCR 技术体系。目前国内外尚未有多重 RT-PCR 技术在西番莲上应用的报道。

本试验在前人研究基础上,首次建立起能同时检测西番莲 TeMV 和 CMV 的病毒检测体系。以单一 RT-PCR 检测为基础,设计两对特异性引物,整体考虑引物浓度、退火温度、循环次数等对双重 RT-PCR 反应的影响,优化反映参数,运用优化后的多重 RT-PCR 技术对样品西番莲进行检测,灵敏度显示建立的双重 RT-PCR 体系具有较高的灵敏性,能够检测到  $10^{-5}$  mg 的组织量,这是多重 PCR 技术在西番莲病毒检测上的首次应用。采用优化后的检测体系对田间采集的西番莲样品进行检测时,检测效果良好,

为西番莲病毒病的快速检测提供了技术支持。同时,笔者发现在建立的双重 RT-PCR 检测体系中,相似的退火温度和引物浓度起着至关重要的作用。在西番莲病毒病的田间检测应用中,可以根据待测样品的 cDNA 浓度调整引物反应浓度,以达到良好的检测效果。

#### 参考文献 References:

- [1] 章宁,林清洪,曾新萍,黄维南. 西番莲生物技术研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2003,32(4): 77-80.  
ZHANG Ning, LIN Qinghong, ZENG Xinping, HUANG Weinan. A review of recent advances in biotechnological research on passionfruit[J]. Subtropical Plant Science, 2003, 32(4): 77-80.
- [2] 韦晓霞,潘少霖,吴如健,王小安,周丹蓉,叶新福. '黄金'黄果西番莲在福建引种初报及栽培要点[J]. 东南园艺,2016(6): 6-8.  
WEI Xiaoxia, PAN Shaolin, WU Rujian, WANG Xiao'an, ZHOU Danrong, YE Xinfu. A preliminary report on introduction of passionflora edulis cv. 'Gold' in Fujian Province and its key cultivation points[J]. Fujian Fruits, 2016(6): 6-8.
- [3] 严佳文,袁启凤,彭志军,王立娟,解璞,陈楠,马玉华. 西番莲病毒病害研究进展[J]. 热带农业科学, 2018, 38(4): 85-94.  
YAN Jiawen, YUAN Qifeng, PENG Zhijun, WANG Lijuan, XIE Pu, CHEN Nan, MA Yuhua. Research progress on viruses of passionfruit[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2018, 38(4): 85-94.
- [4] 徐平东,李梅,柯冲. 福建西番莲病毒病的发生及其病原黄瓜花叶病毒亚组鉴定[J]. 植物保护学报, 1999, 26(1): 50-54.  
XU Pingdong, LI Mei, KE Chong. Occurrence of passionflower

- virus disease and identification of its pathogenic subgroup of *Cucurbit Mosaic virus* in Fujian Province[J]. *Journal of Plant Protection*, 1999, 26(1): 50-54.
- [5] 谢丽雪,张小艳,郑娟,张立杰,李韬. 侵染西番莲的夜来香花叶病毒的分子鉴定及特异性检测[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(24): 4725-4734.
- XIE Lixue, ZHANG Xiaoyan, ZHENG Shan, ZHANG Lijie, LI Tao. Molecular identification and specific detection of *Telosma mosaic virus* infecting passionfruit[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(24): 4725-4734.
- [6] CHANG C A. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(11): 1358-1363.
- [7] CHENG Y H, DENG T C, CHEN C C, CHANG C H, CHANG C A. First report of Euphorbia leaf curl virus and Papaya leaf curl Guangdong virus on passion fruit in Taiwan[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(12): 1746.
- [8] FISCHER I, REZENDE J. Diseases of Passion flower (*Passiflora* spp.)[J]. *Pest Technology*, 2008, 2(1):1-19.
- [9] POLSTON J E, LONDONO M A, COHEN A L, PADILLA-RODRIGUEZ M, ROSARIO K, BREITBART M. Genome Sequence of Euphorbia mosaic virus from Passionfruit and Euphorbia heterophylla in Florida[J]. *Genome Announc*, 2017, 5(9): e01714-16.
- [10] SPIEGEL S, ZEIDAN M, SOBOLEY I, BECKELMAN Y, HOLDENGREBER V, TAM Y. The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(1): 181-189.
- [11] 邹迎春,杨朝柱,覃大吉,赵清华,向极轩,殷红清,杨永康,黄建民,皮磊. 百合病毒的多重 RT-PCR 检测技术[J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(20): 5051-5053.
- ZOU Yingchun, YANG Chaozhu, QIN Daji, ZHAO Qinghua, XIANG Jiqian, YIN Hongqing, YANG Yongkang, HUANG Jianmin, PI Lei. Studies on multiplex RT-PCR detection on viruses of Lily[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(20): 5051-5053.
- [12] 丁芳,曹庆,王国平,易干军,钟云. 柑橘黄龙病、裂皮病和衰退病病原的多重 RT-PCR 检测[J]. *园艺学报*, 2006, 33(5): 947-952.
- DING Fang, CAO Qing, WANG Guoping, YI Ganjun, ZHONG Yun. Studies on the simultaneous detection of citrus Huanglongbing Pathogen, Citrus exocortis viroid, Citrus tristeza virus by multiplex RT-PCR[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(5): 947-952.
- [13] 郑轩,成巨龙,赵震,李正男,王威麟,张昊,吴云锋. 五种烟草病毒 TMV、CMV、TEV、PVY 及 TVBMV 的多重 RT-PCR 同步检测[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(2): 146-153.
- ZHENG Xuan, CHENG Julong, ZHAO Zhen, LI Zhengnan, WANG Weilin, ZHANG Hao, WU Yunfeng. Simultaneous detection of five viruses (TMV, CMV, TEV, PVY and TVBMV) infecting tobacco by multiplex RT-PCR[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(2): 146-153.
- [14] 沈建国,高芳奎,虞赞,蔡伟,李敏,于文涛,廖富荣. 应用 RT-PCR 检测水仙潜隐病毒[J]. *热带作物学报*, 2012, 33(10): 1808-1811.
- SHEN Jianguo, GAO Fangluan, YU Yun, CAI Wei, LI Min, YU Wentao, LIAO Furong. Detection of *Narcissus latent virus* by RT-PCR[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(10): 1808-1811.
- [15] 张业辉,张振臣,蒋士君,秦艳红,张德胜,乔奇,王永江. 3 种甘薯病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(1): 95-98.
- ZHANG Yehui, ZHANG Zhenchen, JIANG Shijun, QIN Yanhong, ZHANG Desheng, QIAO Qi, WANG Yongjiang. Development of a multiplex RT-PCR detection method for three sweet potato potyviruses[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(1): 95-98.
- [16] 刘欢,刘斐,赵磊,郝兴安,吴云锋. 4 种番茄病毒多重 RT-PCR 检测及应用[J]. *植物病理学报*, 2016, 46(5): 716-720.
- LIU Huan, LIU Fei, ZHAO Lei, HAO Xing'an, WU Yunfeng. Multiplex RT-PCR detection and application of four tomato viruses[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(5): 716-720.
- [17] 李唯,许蕊,栗孟飞,王雅琳. 应用多重 RT-PCR 检测甘肃‘成县迟蒜’中的大蒜潜隐病毒和洋葱黄矮病毒[J]. *甘肃农业大学学报*, 2013, 48(2):46-49.
- LI Wei, XU Rui, LI Mengfei, WANG Yalin. Detection of garlic latent virus and onion yellow dwarf virus in ‘Chengxianchisu’ of Gansu by multiplex RT-PCR[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(2):46-49.
- [18] 苏静,陈佰鸿,毛娟,左存武,胡紫璟,王凯. 酿酒葡萄 4 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立[J]. *果树学报*, 2017, 34(5): 632-638.
- SU Jing, CHEN Baihong, MAO Juan, ZUO Cunwu, HU Zijing, WANG Kai. Establishment of multiple RT-PCR detection system for four virus in the cultivars of wine grape[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(5): 632-638.
- [19] 董代幸,张祥林,罗明,韩剑,冯世强,唐德贤,岳仲海. 马铃薯病毒一步法多重 RT-PCR 检测技术的构建[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(1): 131-137.
- DONG Daixing, ZHANG Xianglin, LUO Ming, HAN Jian, FENG Shiqiang, TANG Dexian, YUE Zhonghai. Development of one-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four potato viruses[J]. *Microbiology*, 2011, 38(1): 131-137.
- [20] 蔡志翔,马瑞娟,俞明亮,沈志军,许建兰,张好艳. 利用多重 RT-PCR 检测桃潜隐病毒[C]//中国园艺学会桃分会第二届学术年会论文集. 中国园艺学会桃分会, 中国成都, 2009: 290-296.
- CAI Zhixiang, MA Ruijuan, YU Mingliang, SHEN Zhijun, XU Jianlan, ZHANG Shuyan. Detection of latent virus in peach by multiplex RT-PCR[C]// Papers Collection of the Second Annual meeting of Peach Branch of Chinese Horticulture Society. Chinese Horticultural Society Peach Branch, China Chengdu, 2009: 290-296.
- [21] 匡云波,陈满足,陆伊荣,陈晶,叶祖云. 太子参芜菁花叶病毒和蚕豆萎蔫病毒的双重 RT-PCR 检测[J]. *园艺学报*, 2017, 44(4): 784-791.
- KUANG Yunbo, CHEN Manzu, LU Yirong, CHEN Jing, YE Zuyun. Detection of *Turnip mosaic virus* and *Broad bean wilt virus* in *Pseudostellaria heterophylla* by Duplex RT-PCR[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(4): 784-791.
- [22] 樊荣辉,黄敏玲,钟淮钦,吴建设,罗远华. 文心兰 3 种主要病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立[J]. *福建农业学报*, 2015, 30(7):697-700.
- FAN Ronghui, HUANG Minling, ZHONG Huaiqin, WU Jian-she, LUO Yuanhua. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of three viruses in *Oncidium*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(7): 697-700.
- [23] 范旭东,董雅凤,张尊平,任芳,李亚惠. 葡萄 4 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立[J]. *园艺学报*, 2012, 39(5):949-956.
- FAN Xudong, DONG Yafeng, ZHANG Zunping, REN Fang, LI Yahui. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four grapevine viruses[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(5):949-956.