洋葱黄矮病毒RPA-LFD可视化检测方法的建立及应用

刘然鹏[1,2] 洪 浩[1] 许 帅[1] 阴 筱[1] 房 乐[1] 姜珊珊[1*] 李向东[1,2*]

（1. 山东省农业科学院植物保护研究所，山东省农业有害生物绿色防控重点实验室，济南 250100；
2. 山东农业大学植物保护学院，泰安 271000）

摘要：为建立洋葱黄矮病毒（onion yellow dwarf virus，OYDV）的田间快速检测方法，通过筛选特异性扩增引物、设计探针建立基于重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）和侧流层析试纸条（lateral flow dipstick，LFD）相结合的可视化检测方法，并优化该方法的反应温度和反应时间，验证特异性和灵敏度以及田间样品适用性。结果表明：所建RPA-LFD可视化检测方法有效反应温度范围为38~46 ℃，最适反应温度为44 ℃，最短反应时间为6 min。特异性和灵敏度结果显示，该方法对OYDV具有高度特异性，与韭葱黄条病毒（leek yellow stripe virus，LYSV）、大蒜潜隐病毒（garlic latent virus，GLV）和大蒜普通潜隐病毒（garlic common latent virus，GCLV）等9种常见葱属*Allium*作物病毒均无交叉反应；对OYDV外壳蛋白基因的检测下限可达10^2 copies/μL，灵敏度为聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）的10倍，且可稳定用于田间样品中OYDV的准确检测。该方法操作简便，无需精密仪器与专业操作技能，适用于田间现场快速检测。

关键词：洋葱黄矮病毒；重组酶聚合酶扩增−侧流层析试纸条；大蒜；快速检测

Establishment and application of a visual detection method for onion yellow dwarf virus using RPA-LFD

Liu Ranpeng[1,2] Hong Hao[1] Xu Shuai[1] Yin Xiao[1] Fang Le[1] Jiang Shanshan[1*] Li Xiangdong[1,2*]

（1. Shandong Key Laboratory for Green Prevention and Control of Agricultural Pests, Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong Province, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong Province, China）

Abstract: To establish a rapid field detection method for onion yellow dwarf virus (OYDV), this study developed a visual detection method based on recombinase polymerase amplification (RPA) combined with a lateral flow dipstick (LFD). Specific amplification primers were screened, probes designed, and the reaction temperature and reaction time optimized. The specificity, sensitivity, and field sample applicability of this method were verified, and an OYDV RPA-LFD visual detection system was successfully established. The results showed that the optimal primer-probe combination selected in this study enabled an effective RPA-LFD assay with a reaction temperature range of 38 ℃ to 46 ℃, an optimal reaction temperature of 44 ℃, and a minimum reaction time of six minutes. Specificity and sensitivity tests demonstrated that the method is highly specific to OYDV, showing no cross-reactivity with nine other common *Allium*-infecting viruses, including leek yellow stripe virus (LYSV), garlic latent virus (GLV), and garlic common latent virus (GCLV). The detection limit for the OYDV coat protein (CP)

基金项目：山东省农业科学院创新工程项目（CXGC2024G12，CXGC2025A01）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：xdongli@sdau.edu.cn，shanshan2113@163.com

收稿日期：2025-12-15

gene was 10^2 copies/μL, which is ten times more sensitive than polymerase chain reaction (PCR). Moreover, the assay reliably detected OYDV in field samples. It is easy to operate, requires no sophisticated instrument or professional expertise, and is suitable for rapid on-site detection, thus providing technical support for early monitoring and management of OYDV.

Key words: onion yellow dwarf virus; RPA-LFD; garlic; rapid detection

葱属*Allium*作物是石蒜科重要鳞茎植物，在全球范围内广泛种植，洋葱*Allium cepa*、大蒜*Allium sativum*等是葱属中常见作物，不仅是日常饮食中重要的调味品，还因富含多种营养成分和生物活性物质而备受关注（Augusti，1996；Nohara et al.，2017；Tiberini et al.，2019；Gross，2021）。然而，集约化生产过程中葱属作物受多种生物胁迫影响严重，其中病毒侵染是制约其产量和品质提升的关键因素之一。由于葱属作物多依赖无性繁殖，病毒极易在繁殖材料中累积，并通过种球进行代际传播，导致种质退化与产量下降，给全球洋葱、大蒜等蔬菜产业造成严重的经济损失（Bhusal et al.，2021；肖立等，2023；Nurulita et al.，2024）。葱属作物易受多种病毒侵染，且常为复合侵染（Shiboleth et al.，2001；Makyorukty et al.，2025）。目前已报道侵染葱属作物的病毒达30余种，其中洋葱黄矮病毒（onion yellow dwarf virus，OYDV）是危害最严重、分布最广泛的葱属病毒之一（Tiberini et al.，2019；Shevchenko et al.，2024）。该病毒隶属于马铃薯Y病毒属*Potyvirus*，主要侵染大蒜和洋葱（Pappu et al.，2005；Amer et al.，2024；Nurulita et al.，2024），造成叶片黄化、矮缩、卷曲和畸形等症状（Lot et al.，1998）。该病毒常与其他病毒共同侵染，导致产量减少30%~60%，对葱属作物安全生产构成严重威胁（Lot et al.，1998；Tiberini et al.，2019）。因此，建立快速、准确、灵敏的OYDV检测技术，对其所致病毒病的早期预警、病情监控及抗病育种具有重要意义（Corrado et al.，2024）。

目前，OYDV的检测主要依赖酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）（Kumar et al.，2021）和逆转录聚合酶链反应（reverse transcription polymerase chain reaction，RT-PCR）（Lunello et al.，2004）。这些技术均需专业设备和人员，流程复杂、耗时长，适用于实验室环境。为突破传统技术的局限，近年来多种恒温核酸扩增技术不断发展，无需精密的温控设备即可在恒定温度下实现靶标核酸的快速高效扩增，为开发便携式现场检测工具提供了可能（Buddhachat，2020）。重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）技术是一种新兴的恒温扩增技术（Piepenburg et al.，2006），在37~42 ℃条件下由重组酶、单链DNA结合蛋白和链置换DNA聚合酶协同完成核酸扩增，具有反应快速、设备依赖度低、灵敏度高、模板适配度强等优势（Li et al.，2019；Munawar，2022）。结合侧向层析试纸条（lateral flow dipstick，LFD）进行产物检测，可在5 min内通过肉眼判读结果，适于现场应用。目前，RPA技术已在临床诊断（Zhou et al.，2023）、转基因成分（Wang et al.，2024）、法医物种鉴定（Ye et al.，2024）和动植物有害生物的检测（Hou et al.，2017；Wang et al.，2018；郭凤等，2025）等多个领域得到广泛应用。

尽管RPA-LFD技术在病原检测领域展现出巨大应用潜力（Lee et al.，2021；Onchan et al.，2022；王荣波等，2022；李文扬等，2025），但目前尚未有关于利用该技术检测OYDV的研究报道。本研究拟建立一种基于RPA-LFD的OYDV可视化检测新方法，针对OYDV外壳蛋白（coat protein，CP）的保守序列设计特异性引物和探针，并对反应体系和条件进行系统优化，通过评估该方法的特异性、灵敏度，并利用田间采集的样品进行验证，以期为OYDV的快速诊断提供一种简单、高效、可靠的技术手段，为保障葱属作物的健康生产和产业安全提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品：2024年从山东省济宁、临沂等市采集表现典型病毒病的大蒜田间样品，通过PCR扩增并测序确认为OYDV阳性样品后于−80 ℃保存备用。在市场购入健康大蒜，经PCR检测确认不携带病毒后于−80 ℃保存备用。基于pTO-T7载体构建的携带OYDV、韭葱黄条病毒（leek yellow stripe virus，LYSV）、大蒜病毒A（garlic virus A，GarV-A）、大蒜病毒B（garlic virus B，GarV-B）、大蒜病毒C（garlic virus C，GarV-C）、大蒜病毒D（garlic virus D，GarV-D）、大蒜病毒E（garlic virus E，GarV-E）、大蒜病毒X（garlic virus X，GarV-X）、大蒜潜隐病毒（garlic latent virus，GLV）和大蒜普通潜隐病毒（garlic common latent virus，GCLV）10种常见病毒

*CP*完整基因序列的重组质粒，分别为pTO-CP^{OYDV}、pTO-CP^{LYSV}、pTO-CP^{GarV-A}、pTO-CP^{GarV-B}、pTO-CP^{GarV-C}、pTO-CP^{GarV-D}、pTO-CP^{GarV-E}、pTO-CP^{GarV-X}、pTO-CP^{GLV}和pTO-CP^{GCLV}，均由本实验室构建与保存。

试剂及仪器：RNA恒温快速扩增试剂盒（基础型）、RNA恒温快速扩增试剂盒（胶体金试纸条型），安普未来（常州）生物科技有限公司；Tiosbio®一次性核酸检测试纸条（彩虹型），北京宝盈同汇生物技术有限公司；2×Universal SYBR Green qPCR Mix，山东思科捷生物技术有限公司；2×Accurate *Taq* Master Mix，湖南艾科瑞生物工程有限公司；M5 Total RNA Extraction Reagent（TRIgent），北京聚合美生物科技有限公司；Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（gDNA Digester Plus），翌圣生物科技（上海）股份有限公司；Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；EZ-10柱式DNA胶回收试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；pTO快速克隆试剂盒，通用生物（安徽）股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。T20 PCR扩增仪，杭州朗基科学仪器有限公司；QuantStudio TM5实时荧光定量PCR仪，美国Thermo Fisher公司；ZF-288全自动凝胶成像分析系统，上海嘉鹏科技有限公司；NanoDrop™ One超微量分光光度计，赛默飞世尔（上海）仪器有限公司；JY300E型通用电泳仪电源，北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2　方法

1.2.1　总RNA提取和cDNA合成

取携带OYDV的大蒜样品、健康大蒜样品0.3 g大蒜叶片，使用M5 Total hNA Extraction Reagent（TRIgent）试剂盒提取大蒜总RNA后，利用Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（gDNA Digester Plus）试剂盒合成第一链cDNA用于聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测。

1.2.2　RPA引物的设计和筛选

下载NCBI中已报道的OYDV *CP*基因序列，利用Geneious Prime 9.0.2软件进行比对分析，针对其保守区域设计OYDV-RPA-1F/OYDV-RPA-3R、OYDV-RPA-2F/OYDV-RPA-3R和OYDV-RPA-3F/OYDV-RPA-3R共3对RPA引物（表1）。本试验所有引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

以pTO-CP^{OYDV}重组质粒为模板，使用3组引物进行PCR反应。以ddH_2O作空白对照。10 μL PCR反应体系：2×Accurate *Taq* Master Mix 5.0 μL、10 μmol/L上下游引物各0.2 μL、模板0.2 μL、ddH_2O 4.6 μL。反应程序：95 ℃预变性2 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，共32个循环；最终72 ℃延伸5 min。取5 μL扩增产物使用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测。对比不同引物对扩增出的条带亮度。

分别以pTO-CP^{OYDV}重组质粒为模板，和以携带OYDV的大蒜RNA为模板，使用3组引物（表1）进行RPA扩增反应。以ddH_2O为空白对照，以健康大蒜RNA为阴性对照。50 μL RPA反应体系：Buffer A 29.4 μL、Buffer B 2.5 μL、上下游引物各2.0 μL、重组质粒1.0 μL/RNA 2.5 μL，ddH_2O补足至50 μL。将上述混合液与试剂盒中配套的干粉混匀后使用PCR仪进行恒温孵育，反应条件为42 ℃恒温反应30 min。反应结束后，加入体积比25∶24∶1的酚∶氯仿∶异戊醇提取液50 μL混匀，12 000 r/min离心5 min，取5 μL上清液与6×Loading Buffer 1 μL混匀后点样，使用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测。综合以上3个扩增反应中扩增条带特异性以及扩增条带亮度结果筛选最适的RPA扩增引物。

表1　本研究所用引物信息

Table 1　The information of primers used in this study

引物名称 Primer name	序列（5′–3′） Sequence (5′–3′)	用途 Purpose
OYDV-RPA-1F	GGAGACGGGGAAGACGCAGCAGCACAACCAAG	RPA, qPCR, PCR
OYDV-RPA-3R	TGCCAACCTTTGGAAATCTCATTTTATC	RPA, qPCR, PCR
OYDV-RPA-2F	GGGGAAGATGCAGCGGCACAATCAAGCAC	RPA, PCR
OYDV-RPA-3F	GGDGAAGATGCAGCRGCACAATCAAGCAC	RPA, PCR, RPA-LFD
18S-F	GAATGACTCCTGGCAATG	PCR
18S-R	GATTGGAATGACGCTATACA	PCR
OYDV-det-F	GTGATGCAGCTGAAGCATAC	PCR
OYDV-det-R	CGTTACCATCCAGGCCAAAC	PCR
OYDV-RPA-3R-Biotin	Biotin-TGCCAACCTTTGGAAATCTCATTTTATC	RPA-LFD
OYDV-Probe	FAM-AAGCAGAAGGATAAAGATGTTGATACTGG-THF-ACAACTGGCAAATTT-C3-Spacer	RPA-LFD

1.2.3 RPA-LFD引物探针设计

根据Tiosbio®一次性核酸检测试纸条(彩虹型)的要求设计探针,探针5′端添加FAM荧光集团标记,中间添加THF识别标记,3′端添加C3-Spacer进行封闭,并对筛选的下游引物5′端添加Biotin抗原标记(表1)。所用引物和探针OYDV-Probe均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。为验证设计的探针是否与筛选出的最优RPA引物对匹配,以携带OYDV的大蒜样品的总RNA为模板,使用筛选的最适RPA扩增引物结合探针进行RPA扩增。50 μL反应体系:Buffer A 29.4 μL、Buffer B 2.5 μL、上下游引物各2.0 μL、探针0.6 μL、重组质粒1 μL,ddH_2O补足至50 μL。将上述混合液与试剂盒中配套的干粉混匀后使用PCR仪进行孵育,于42 ℃恒温反应15 min。孵育结束后,取10 μL扩增产物用ddH_2O稀释至200 μL,混匀后放入试纸条,5 min内观察结果。以健康大蒜的总RNA为模板作对照,若阳性样品试纸条同时出现清晰的检测线(T线)和质控线(C线),而对照仅C线显色,则表明探针与引物匹配良好,适用于RPA检测。

1.2.4 RPA-LFD扩增及反应体系优化

以pTO-CP^{OYDV}重组质粒为模板,使用RNA恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行RPA-LFD扩增反应。RPA-LFD反应体系同1.2.3,分别设置2、4、6、8、10 min五个反应时间梯度和36、38、40、42、44、46、48、50 ℃八个温度梯度对反应条件进行优化。孵育结束后,取10 μL扩增产物用ddH_2O稀释至200 μL,混匀后放入试纸条,5 min内观察结果。质控线和检测线显示清晰,判定结果为阳性;质控线显示清晰,检测线无条带时,判定结果为阴性;质控线未出现条带时,判定结果无效。在质控线清晰的前提下,根据检测线条带亮度筛选最适反应温度和反应时间。

1.2.5 RPA-LFD特异性分析

分别以pTO-CP^{OYDV}、pTO-CP^{LYSV}、pTO-$CP^{GarV\text{-}A}$、pTO-$CP^{GarV\text{-}B}$、pTO-$CP^{GarV\text{-}C}$、pTO-$CP^{GarV\text{-}D}$、pTO-$CP^{GarV\text{-}E}$、pTO-$CP^{GarV\text{-}X}$、pTO-CP^{GCLV}和pTO-CP^{GLV}共10种病毒的重组质粒为模板,通过PCR、RPA和RPA-LFD验证引物及探针特异性。PCR和RPA反应体系与程序同1.2.2,RPA-LFD 50 μL反应体系:Buffer A 29.4 μL、Buffer B 2.5 μL、上下游引物各2.0 μL、探针0.6 μL、重组质粒1 μL,ddH_2O补足至50 μL。将上述混合液与试剂盒中配套的干粉混匀后使用PCR仪进行孵育,于44 ℃恒温反应6 min。孵育结束后,取10 μL扩增产物用ddH_2O稀释至200 μL,混匀后放入试纸条,5 min内观察结果。

1.2.6 RPA-LFD检测灵敏性分析

将pTO-CP^{OYDV}重组质粒使用超微量分光光度计计算浓度,并按10倍梯度稀释,制备成浓度范围为10^9~10^0 copies/μL的系列稀释液。以此系列质粒稀释液为模板,分别进行PCR、荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction,qPCR)和RPA-LFD检测,比较3种方法的检测灵敏度。PCR反应体系与程序同1.2.2,取5 μL扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,以能观察到清晰目的条带的最低模板浓度作为该反应的检测灵敏度。20 μL qPCR反应体系:2×Universal SYBR Green qPCR Mix 10 μL、10 μmol/L上下游引物(表1)各0.4 μL、重组质粒稀释液模板0.3 μL、ddH_2O 8.9 μL。反应程序:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性10 s,60 ℃退火30 s,共40个循环。根据浓度建立*Ct*值与模板拷贝数的标准曲线,以能稳定产生可信*Ct*值的最低拷贝数作为检测灵敏度。RPA-LFD反应体系与程序同1.2.5,以能清晰观察到检测线显色的最低模板浓度作为可视化检测灵敏度。

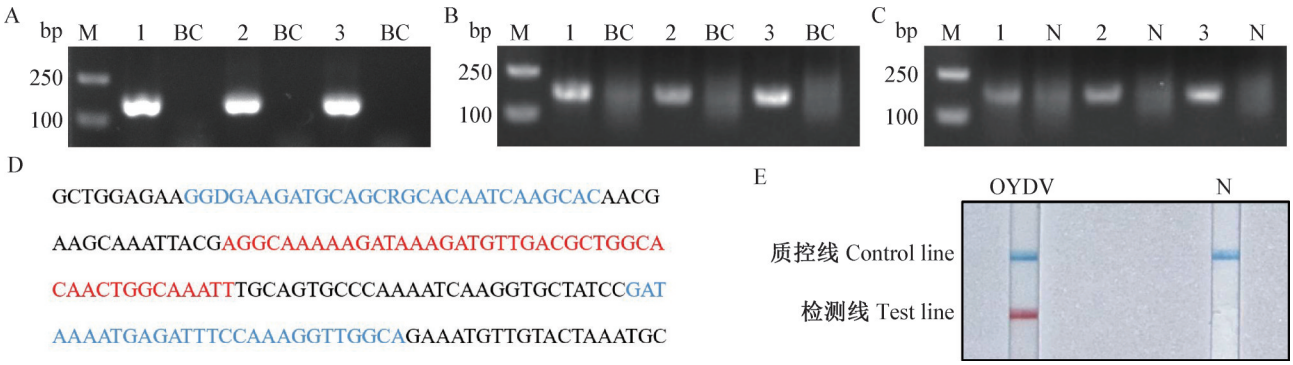
1.2.7 田间样品检测

随机选取10份疑似感染OYDV的田间大蒜样品,按照1.2.1方法提取RNA并反转录获得cDNA。以cDNA为模板、OYDV-det-F/OYDV-det-R(表1)为检测引物进行PCR检测,PCR反应体系与程序同1.2.2,内参引物为18S-F/18S-R(表1)。以RNA为模板进行RPA-LFD检测,反应体系与程序同1.2.5。通过比较2种方法的检测结果的一致性,判断RPA-LFD检测方法是否可靠。

2 结果与分析

2.1 RPA引物筛选和探针设计

3对RPA扩增引物筛选结果显示,3对引物在3个反应体系中皆能扩增到单一、特异、符合预期大小的目标条带,其中引物对OYDV-RPA-3F/OYDV-RPA-3R在3个反应体系中的目的条带皆最亮,最终确定为最佳引物(图1-A~C)。根据引物对在CP序列上的位置,设计探针序列OYDV-Probe(图1-D)。将抗原标记后的引物和探针OYDV-Probe组合,使用试纸条对扩增结果进行检测,结果显示阳性模板的扩增产物出现明显的红色阳性检测线,阴性模板的扩增产物未出现红色阳性检测线(图1-E),表明引物对OYDV-RPA-3F/3R-Biotin及探针OYDV-Probe组合可用于OYDV的RPA-LFD扩增。



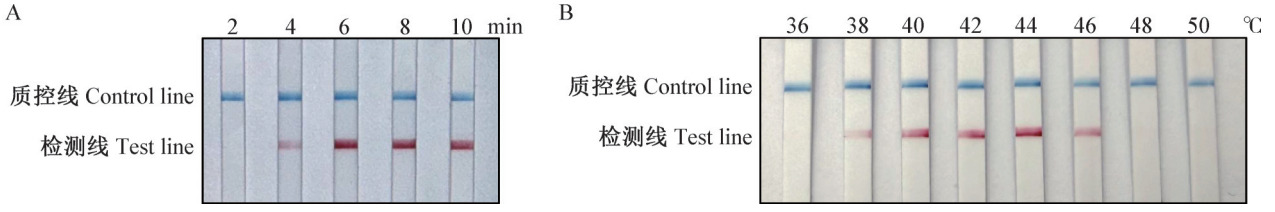
A：以pTO-CP^{OYDV}为模板进行PCR检测；B：以pTO-CP^{OYDV}为模板进行RPA检测；C：以携带OYDV的大蒜RNA为模板进行RPA检测；D：蓝色标注为F/R扩增引物在序列中的位置，红色标注为探针在序列中的位置；E：测流层析试纸条检测RPA产物。M：DL 2000 marker。1：OYDV-RPA-1F/OYDV-RPA-3R；2：OYDV-RPA-2F/OYDV-RPA-3R；3：OYDV-RPA-3F/OYDV-RPA-3R；BC：空白对照；N：阴性对照。A: PCR detection using pTO-CP^{OYDV} as template; B: RPA detection using pTO-CP^{OYDV} as template; C: RPA detection using RNA extracted from OYDV-infected garlic as template; D: blue labels indicate the positions of the forward/reverse amplification primers in the sequence, and red labels indicate the position of the probe; E: visual inspection of RPA products with lateral flow dipstick. M: DL 2000 marker. 1: OYDV-RPA-1F /OYDV-RPA-3R; 2: OYDV-RPA-2F/OYDV-RPA-3R; 3: OYDV-RPA-3F/OYDV-RPA-3R; BC: blank control; N: negative control.

图1 OYDV RPA-LFD引物筛选与探针设计

Fig. 1 Screening of primers and probe design for OYDV RPA-LFD

2.2 RPA-LFD扩增条件优化

不同反应时间的RPA-LFD检测结果表明，在反应时间为4~10 min，试纸条测试区均出现了单一的红色条带，其中反应6 min时即可观察到清晰目标条带（图2-A）。不同温度条件的RPA-LFD检测结果表明，反应温度在38~46 ℃范围内，均可检测到目标条带，其中反应温度为44 ℃时，目标条带最清晰（图2-B）。



A：最佳反应时间筛选；B：最佳反应温度筛选。A: Screening of optimal reaction time; B: screening of optimal reaction temperature.

图2 OYDV RPA-LFD扩增条件优化

Fig. 2 Optimization of amplification conditions for OYDV RPA-LFD

2.3 RPA-LFD特异性分析

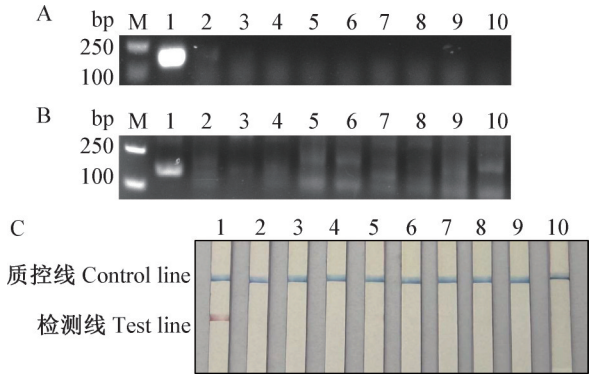
利用优化后的RPA-LFD反应体系，分别以常发大蒜病毒*CP*基因序列的重组质粒为模板，进行RPA-LFD特异性分析，结果显示，仅OYDV样品出现阳性信号，其他样品均为阴性（图3），表明建立的RPA-LFD检测方法能特异性检测OYDV，与其他9种常见大蒜病毒无交叉反应。

2.4 RPA-LFD灵敏度检测

PCR反应中当重组质粒浓度为10^3 copies/μL时可勉强检出条带（图4-A）；qPCR的最低检测限为10^2 copies/μL（图4-B）；RPA-LFD的反应结果显示，当质粒浓度为10^2 copies/μL时仍可观察到清晰的检测线（图4-C）。表明RPA-LFD与qPCR最低检测限一致，均可达到10^2 copies/μL，比PCR的灵敏度高10倍。

2.5 田间样本检测

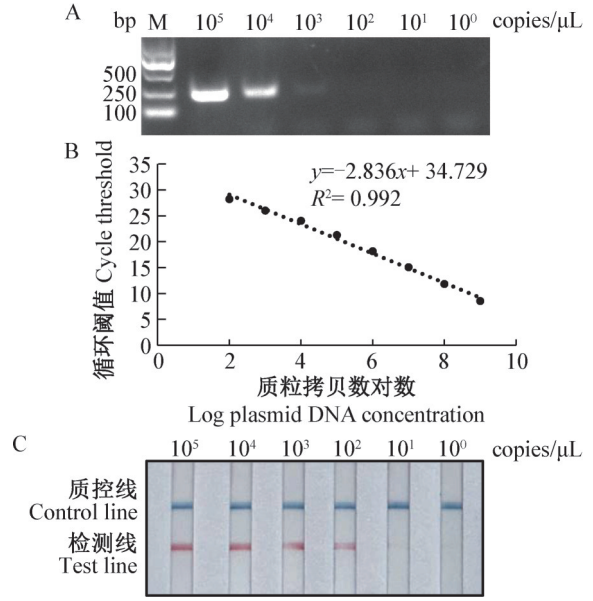
田间样本检测结果显示，PCR和RPA-LFD两种方法的检测结果完全一致（图5）。其中，9份样品被检测为OYDV阳性，1份为阴性，阳性检出率为90.00%。表明本研究建立的RPA-LFD检测方法稳定可靠，能够准确检测出田间样品中的OYDV，具有良好的实际应用潜力。



A~C：以重组质粒为模板进行PCR、RPA和RPA-LFD检测。1~10：pTO-CP^{OYDV}、pTO-CP^{LYSV}、pTO-CP^{GarV-A}、pTO-CP^{GarV-B}、pTO-CP^{GarV-C}、pTO-CP^{GarV-D}、pTO-CP^{GarV-E}、pTO-CP^{GarV-X}、pTO-CP^{GLV}和pTO-CP^{GCLV}；M：DL 2000 marker。A–C: PCR, RPA, RPA-LFD detection using recombinant plasmids as templates, respectively. 1–10: pTO-CP^{OYDV}, pTO-CP^{LYSV}, pTO-CP^{GarV-A}, pTO-CP^{GarV-B}, pTO-CP^{GarV-C}, pTO-CP^{GarV-D}, pTO-CP^{GarV-E}, pTO-CP^{GarV-X}, pTO-CP^{GLV} and pTO-CP^{GCLV}; M: DL 2000 marker.

图3 OYDV RPA-LFD特异性验证

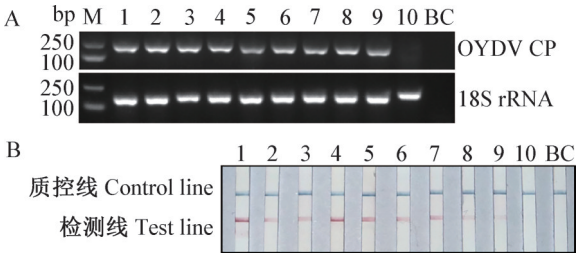
Fig. 3 Specificity validation of OYDV RPA-LFD



A：以梯度稀释的pTO-CP^{OYDV}为模板进行PCR检测；B：以梯度稀释的pTO-CP^{OYDV}为模板进行qPCR检测标准曲线；C：以梯度稀释的pTO-CP^{OYDV}为模板进行RPA-LFD检测；M：DL 2000 marker。A: PCR detection using serially diluted pTO-CP^{OYDV} as template; B: standard curve of qPCR detection using serially diluted pTO-CP^{OYDV} as template; C: RPA-LFD detection using serially diluted pTO-CP^{OYDV} as template; M: DL 2000 marker.

图4 OYDV PCR、qPCR和RPA-LFD灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivity comparison of OYDV PCR, qPCR, and RPA-LFD



A：以cDNA为模板进行PCR检测；B：以RNA为模板进行RPA-LFD检测；1~10：疑似感染OYDV的10份田间大蒜样品；BC：空白对照；M：DL 2000 marker。A: PCR detection using cDNA as templates; B: RPA-LFD detection using RNA as templates; 1–10: 10 field garlic samples suspected of OYDV infection; M: DL 2000 marker.

图5 田间大蒜样品OYDV检测结果

Fig. 5 Detection results of OYDV in field garlic samples

3 讨论

OYDV在全球广泛分布，严重威胁葱属作物的安全生产（Shevchenko et al.，2024）。快速、准确地检测OYDV对保障葱属作物健康至关重要。本研究以OYDV保守的*CP*基因为靶标，基于RPA技术，结合LFD试纸条，建立了一种可视化检测OYDV的方法。该方法具有快速、准确、灵敏、操作简便的特点，适用于OYDV的现场快速诊断。

为提高检测特异性，本研究将OYDV与同属大蒜病毒LYSV的*CP*基因序列进行多序列比对，选取同源性较低的区域设计特异性引物和探针。特异性检测结果显示，本研究建立的RPA-LFD检测方法仅对OYDV产生阳性信号，与其他9种葱属作物常见病毒均无交叉反应，表现出良好的特异性。在灵敏度方面，该方法的检测下限可达到10^2 copies/μL，与qPCR的灵敏度相当，比常规PCR的灵敏度高出10倍。与已报道的环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）检测方法相比，本方法在灵敏度、反应时间及温度要求方面均更具优势，可有效检出早期感染或无症状带毒植株中的低滴度病毒，对葱属作物病毒病害的早期预警及传播阻断具有重要意义（Tiberini et al.，2019）。

在检测效率与操作便捷性方面，该方法从恒温扩增到结果判读全程不足15 min，时长显著短于PCR检测，具备作为田间监测工具的潜力。该检测技术在38~46 ℃的恒温环境下均可反应，无需复杂的温控设备，仅需简易恒温装置，大幅降低了对设备的要求（Li et al.，2019；Munawar，2022）。结合LFD

试纸条可视化判读，突破了PCR、qPCR等分子检测技术依赖专业技术人员和设备的局限性，极大提升了田间及基层场所病毒诊断的技术适用性（Lee et al.，2021；Onchan et al.，2022）。

OYDV属于马铃薯Y病毒属，来源于不同地理区域和不同物种的分离物间存在一定的遗传差异（Tsuneyoshi et al.，1998；Chen et al.，2003）。本研究主要基于大蒜感病样品验证了RPA-LFD方法的检测效果，结果显示RPA-LFD对田间样本的检测结果与PCR检测结果一致，证实了其在田间实际应用中的稳定性和可靠性。后续将扩大田间样本范围，针对不同的OYDV分离株进行测试，以进一步评估该方法的普适性。同时，致力于开发同时检测OYDV、LYSV等多种葱属病毒的多重RPA-LFD检测体系，以提高复合侵染样品中病毒的检测效率。

综上所述，本研究开发的RPA-LFD可视化检测方法具有快速、特异、灵敏和操作简便的特点，能够有效满足OYDV现场快速检测的需求，弥补了现有检测技术在检测速度、设备依赖性及现场适用性方面的不足。该方法为葱属作物病毒病的现场诊断和科学防控提供了一种创新技术手段，也为洋葱、大蒜产业的健康发展和绿色防控提供了实用的技术保障。

参 考 文 献（References）

Amer M, Amir M, Hussain K, Al-Shahwan I, Al-Saleh M. 2024. Characterization of garlic virus a, garlic virus d, and onion yellow dwarf virus infecting onion. Advancements in Life Sciences, 11 (4): 791

Augusti KT. 1996. Therapeutic values of onion *Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L. Indian Journal of Experimental Biology, 34(7): 634−640

Bhusal H, Shemesh-Mayer E, Forer I, Kryukov L, Peters R, Kamenetsky-Goldstein R. 2021. Bulbils in garlic inflorescence: development and virus translocation. Scientia Horticulturae, 285: 110146

Buddhachat K. 2020. LAMP assay is an auxiliary tool for rapid and sensitive pathogen diagnosis in veterinary areas. Veterinary Integrative Sciences, 20(2): 247−251

Chen J, Adams MJ, Zheng HY, Chen JPH. 2003. Sequence analysis demonstrates that onion yellow dwarf virus isolates from China contain a p3 region much larger than other *Potyviruses*. Archives of Virology, 148(6): 1165−1173

Corrado CL, Micali G, Mauceri A, Bertin S, Sunseri F, Abenavoli MR, Tiberini A. 2024. Study on Italian onion cultivars/ecotypes towards onion yellow dwarf virus (OYDV) infection. Horticulturae, 10(1): 73

Gross M. 2021. All about *Allium*. Current Biology, 31(22): R1449−R1452

Guo F, Liu HR, Lü SM, Li YL, Sun WX, Wang JY. 2025. Rapid detection method for rice brown leaf spot pathogen *Bipolaris oryzae* based on RPA/CRISPR-Cas12b technology. Journal of Plant Protection, 52(4): 812−821 (in Chinese) [郭凤, 刘华容, 吕世民, 李艺霖, 孙文献, 汪激扬 . 2025. 基于重组酶聚合酶扩增/CRISPR-Cas12b技术的水稻胡麻叶斑病病原菌快速检测方法 . 植物保护学报, 52(4): 812−821]

Hou PL, Wang HM, Zhao GM, He CQ, He HB. 2017. Rapid detection of infectious bovine rhinotracheitis virus using recombinase polymerase amplification assays. BMC Veterinary Research, 13(1): 386

Kumar R, Pant RP, Kapoor S, Khar A, Baranwal VK. 2021. Development of polyclonal antibodies using bacterially expressed recombinant coat protein for the detection of onion yellow dwarf virus (OYDV) and identification of virus free onion genotypes. 3 Biotech, 11(8): 388

Lee HJ, Cho IS, Ju HJ, Jeong RD. 2021. Rapid and visual detection of tomato spotted wilt virus using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. Molecular and Cellular Probes, 57: 101727

Li J, MacDonald J, von Stetten F. 2019. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. Analyst, 144(1): 31−67

Li WY, Xiu JQ, Xu ZH, Wang M, Gu QS, Kang BS, Liu LM, Zhao SJ, Yushanjiang Maimaiti, Wu HJ. 2025. Establishment and application of a rapid detection technique for watermelon silver mottle virus based on RT-RPA-LFD. Acta Horticulturae Sinica, 52(11): 3079−3089 (in Chinese) [李文扬, 修筠清, 徐志红, 王敏, 古勤生, 康保珊, 刘莉铭, 赵胜杰, 玉山江·麦麦提, 吴会杰 . 2025. 基于RT-RPA-LFD等温扩增的西瓜银斑驳病毒快速检测技术的建立及应用 . 园艺学报, 52(11): 3079−3089]

Lot H, Chovelon V, Souche S, Delecolle B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease, 82(12): 1381−1385

Lunello P, Mansilla C, Conci V, Ponz F. 2004. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. Journal of Virological Methods, 118(1): 15−21

Makyorukty D, Nurulita S, Dinarti D, Hidayat SH. 2025. Viruses infecting garlic in Indonesia: incidence and its transmission to shallot and spring onion. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 48(3): 851−866

Munawar MA. 2022. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology. Expert Review of Molecular Diagnostics, 22(7): 725−737

Nohara T, Fujiwara Y, El-Aasr M, Ikeda T, Ono M, Nakano D, Kinjo J. 2017. Antitumor *Allium* sulfides. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 65(3): 209−217

Nurulita S, Mawarni S, Hidayat SH. 2024. Identification of garlic viruses associated with seed bulbs and consumption bulbs from several locations in Indonesia. HAYATI Journal of Biosciences,

31(4): 733−743

Onchan W, Ritbamrung O, Changtor P, Pradit W, Chomdej S, Nganvongpanit K, Siengdee P, Suyasunanont U, Buddhachat K. 2022. Sensitive and rapid detection of *Babesia* species in dogs by recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick (RPA-LFD). Scientific Reports, 12: 20560

Pappu HR, Hellier BC, Dugan FM. 2005. First report of onion yellow dwarf virus, leek yellow stripe virus, and garlic common latent virus in garlic in Washington State. Plant Disease, 89(2): 205

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. 2006. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biology, 4(7): e204

Shevchenko O, Snihur H, Shevchenko T, Budzanivska I. 2024. Onion and garlic//Awasthi LP. Viral diseases of field and horticultural crops. USA: Academic Press, pp. 505−512

Shiboleth YM, Gal-On A, Koch M, Rabinowitch HD, Salomon R. 2001. Molecular characterisation of onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. Annals of Applied Biology, 138(2): 187−195

Tiberini A, Tomlinson J, Micali G, Fontana A, Albanese G, Tomassoli L. 2019. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of onion yellow dwarf virus. Journal of Virological Methods, 271: 113680

Tsuneyoshi T, Matsumi T, Natsuaki KT, Sumi S. 1998. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three *Potyvirus* species in *Allium* plants. Archives of Virology, 143(1): 97−113

Wang HM, Hou PL, Zhao GM, Yu L, Gao YW, He HB. 2018. Development and evaluation of serotype-specific recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus serotype A, O and Asia1. BMC Veterinary Research, 14(1): 359

Wang JB, Wang Y, Hu XW, Chen YF, Jiang W, Liu XF, Liu J, Zhu LM, Zeng HJ, Liu H. 2024. A dual-RPA based lateral flow strip for sensitive, on-site detection of *CP4-EPSPS* and *Cry1Ab*/*Ac* genes in genetically modified crops. Food Science and Human Wellness, 13(1): 183−190

Wang RB, Chen SZ, Zhao YM, Li BJ, Liu PQ, Chen QH. 2022. Development of a recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick assay for rapid detection of the taro leaf blight pathogen *Phytophthora colocasiae*. Journal of Plant Protection, 49(6): 1654−1662 (in Chinese) [王荣波, 陈姝樽, 赵玉梅, 李本金, 刘裴清, 陈庆河. 2022. 芋疫霉重组聚合酶扩增结合侧流层析试纸条快速检测方法的建立及应用. 植物保护学报, 49(6): 1654−1662]

Xiao L, Cheng C, Shi CP, Sun XH, Sun ZW, Wang SS, Zhu XP. 2023. Identification of pathogenic species of garlic virus diseases in Shandong Province. Acta Phytopathologica Sinica, 53(2): 338−342 (in Chinese) [肖立, 程超, 石朝鹏, 孙晓辉, 孙作文, 王树森, 竺晓平. 2023. 山东省大蒜病毒病害的病原种类鉴定. 植物病理学报, 53(2): 338−342]

Ye CX, Tang X, Yang FQ, Zhang XY, Shang YJ, Xia Y, Wang YX, Guo SJ, Zha L, Guo YD, et al. 2024. Rapid and accurate detection of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick. Insects, 15(12): 1008

Zhou H, Xu ZC, He L, Wang ZJ, Zhang T, Hu T, Huang FW, Chen DJ, Li Y, Yang YH, et al. 2023. Coupling CRISPR/Cas12a and recombinase polymerase amplification on a stand-alone microfluidics platform for fast and parallel nucleic acid detection. Analytical Chemistry, 95(6): 3379−3389

（责任编辑：王 璇）