

马铃薯卷叶病毒分子鉴定及一步 RT-PCR 检测

Molecular identification and detection of potato leafroll virus by RT-PCR

周国辉¹ 李梅辉² 许东林¹ 蔡艳清¹

(1. 华南农业大学资环学院, 广州 510642; 2. 广东省植保总站, 广州 510500)

Zhou Guo-hui¹ Li Mei-hui² Xu Dong-lin¹ Cai Yan-qing¹

(1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. General Station of Plant Protection, Agricultural Department of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China)

病毒病的危害对马铃薯产量和品质构成较严重的影响。2003 年初广东省阳东县田间约 70% 的植株呈现典型的马铃薯卷叶病毒 (potato leafroll virus, PLRV) 病症状。为此, 笔者对其病原进行了分子鉴定, 并建立了一步 RT-PCR 检测技术。

1 材料与方法

1.1 样品采集与制备: 采集表现典型卷叶症状的病株上部初卷叶片 50mg, 用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司) 抽提叶组织总 RNA, 溶于 50 μ L 无 RNA 酶污染的双蒸水中, 以健康无症植株叶片为对照。

1.2 PCR 引物设计及最佳引物对筛选: 根据 GenBank 报道的 PLRV 基因组序列, 在其 CP 基因两侧设计 1 对引物 P₁ (5'-cctcggtacatcaaccgga-3', -141 ~ -123 位)、P₂ (5'-agttctggt-tctcgtctc-3', +816 ~ +799 位), 用于 RT-PCR 扩增, 通过产物克隆和序列分析对病原病毒鉴定。在明确阳东县 PLRV 分离物 CP 基因序列之后, 再以其为依据设计检测引物 P₁₋₁ (5'-gagttcagccagtggttatg-3', +92 ~ +109 位)、P₂₋₁ (5'-ggaactgttgacgtaggac-3', +451 ~ +432 位)。上述 4 条引物经组合形成 4 个引物对, 从中筛选出 1 个最佳引物对, 用于病毒检测。

1.3 一步 RT-PCR 反应、产物电泳、回收及克隆测序: 采用宝生物工程 (大连) 有限公司的一步法 RT-PCR 试剂盒, 反应体系参照试剂盒说明。反应程序为: 47 $^{\circ}$ C 反转录 30min; 94 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 0.5min, 55 $^{\circ}$ C 0.5min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, UVP 凝胶成像系统观察和照相。采用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司) 切胶回收目的 DNA 分子。回收 DNA 分子克隆于 pMD 18-T 载体, 双脱氧链末端终止法对重组质粒进行双向测序 (由宝生物工程 (大连) 有限公司完成)。

1.4 待检测种薯的处理: 马铃薯种薯 (荷兰 15 号) 由阳东县农业局提供。用自来水洗净

基金项目: 广东省农业厅项目 (F01040)

作者简介: 周国辉 (1963 -), 男, 副教授, 研究方向为植物病毒及病毒病害防治 (E-mail: ghzhou@scau.edu.cn)

收稿日期: 2003 - 06 - 22

种薯块茎,按芽眼切成适度大小的薯块,每个种薯取 1 个薯块,播种于磁盘里河沙中,置于光照培养箱,每天光照 12h,28℃保湿培养,约 2 周后马铃薯幼苗长出 3~4 片叶,取幼嫩的平展叶片进行病毒检测。

2 结果与分析

2.1 病叶总 RNA 一步 RT-PCR 扩增

以表现卷叶症状病叶组织总 RNA 抽提液为模板,采用引物对 $P_1 - P_2$, 进行一步 RT-PCR 扩增。在 3 次试验中,共计 15 个病叶样品均获得约 960bp 的 DNA 电泳条带,不同样品电泳带存在强弱差异,可能与抽提质量有关。健康对照样品无任何扩增电泳带。

2.2 RT-PCR 产物克隆测序及序列比较

测序结果表明,RT-PCR 扩增产物序列全长 960bp,其中第 142~144 位为翻译起始密码 ATG,第 767~769 位为翻译终止密码 TAG,构成一个 627bp 的开读框。与 GenBank 中已报道的基因序列进行比较,显示该开读框序列与世界各地已报道的 PLRV 各株系或分离物的 CP 基因高度同源;与法国 Noir 株系及中国河北张家口分离物完全相同;与中国内蒙古分离物、福建分离物、加拿大分离物、古巴 CU87 株系及津巴布韦 Zim13 株系的同源率均为 99% 以上;与苏格兰 V4 株系、澳大利亚分离物及南非分离物同源率分别为 98%、97% 和 96%。由此,鉴定阳东县马铃薯病毒病的主要病原为 PLRV。

2.3 RT-PCR 检测 PLRV 最佳引物对筛选

所设计的 4 对引物都能在一部 RT-PCR 中扩增出预期大小的目的片段,但引物对 $P_{1-1} - P_2$ 及 $P_1 - P_{2-1}$ 的扩增产物量太少,易受样品质量影响;引物对 $P_{1-1} - P_{2-1}$ 出现一些较弱的非特异扩增产物;而引物对 $P_1 - P_{2-1}$ 扩增产物电泳带最为单一、明亮,为检测最佳引物对。结果显示, $P_1 - P_{2-1}$ 检测 PLRV 的灵敏度为 10^{-5} 总 RNA 抽提液。

2.4 种薯样品病毒检测

采用引物对 $P_1 - P_{2-1}$,对供检测的 30 个样品进行一步 RT-PCR,结果有 18 个样品获得目的扩增片段,即在 60% 的种薯中检测到 PLRV。

3 讨论

基因序列分析揭示,阳东县 PLRV CP 基因与法国 Noir 株系、我国河北张家口分离物完全相同,由此可以推导 PLRV 可能是通过种薯从法国(或欧洲其他国家)传入我国河北,再由河北传入广东阳东县。经查询得知该县种薯(荷兰 15 号)确系自河北引入,河北的种薯来源未作进一步查询。

马铃薯在种植生长过程中会受到多种病毒的侵染,在种薯的脱毒生产及调运过程中,进行病毒检测是十分必要的。常用的血清学检测方法存在一些不足之处,如高效价的特异性抗血清难以制备、贮运条件要求严格等。分子检测方法不但更加快捷、特异性更强、灵敏度更高,而且检测试剂易得、通用性强、成本亦不高。PLRV 在寄主体内含量极低且仅分布于韧皮部,发展分子检测技术尤显重要。本研究在操作过程中全部采用国产试剂盒,大大降低了检测成本。RT-PCR 在近年来越来越趋向于采用一步法进行反应。与两步法相比,既简化了操作程序、降低了样品交叉污染的可能性,又降低了成本,为开发同时检测多种病毒的多重 RT-PCR 创造了有利条件。