

利用 RT-PCR 技术检测辣椒轻斑驳病毒的研究

郑 敏¹, 郭世辉¹, 张娜娜¹, 杨洪一^{1,2}

(1. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:在田间病害调查过程中发现的一批感染病毒病的辣椒样本,经摩擦接种技术将病毒接种于烟草叶片,以期进行病毒鉴定。结果表明:经摩擦接种后烟草叶片显示斑驳、花叶症状;采用 CTAB 法提取辣椒及烟草叶片总 RNA,利用 RT-PCR 技术,以辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)特异引物,扩增出了预期大小片段,经测序证明其为 PMMoV 特异片段。

关键词:辣椒轻斑驳病毒;摩擦接种;RT-PCR

中图分类号:S 436 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0127-03

辣椒是中国乃至世界各地重要的蔬菜之一,病毒病是严重影响辣椒生产的主要病害之一。目前已知烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)、苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、辣椒轻斑驳病毒(*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)等均能感染辣椒。PMMoV 最早在美国发现,我国于 1994 年首次在新疆辣椒上发现^[1]。近年来北京近郊也出现了 PMMoV,且有扩大蔓延的趋势^[2-4]。辣椒叶片被感染后,呈轻度萎黄和矮小症状,症状依感染时期而不同^[5]。PMMoV 为烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员,病毒粒体直杆状,为正单链 RNA 病毒,可通过种传和汁液摩擦接种传播,带毒种子、感病植株和病土是主要的侵染来源^[6]。现对在吉林、黑龙江地区进行田间病害调查过程中发现的一批感染病毒病的辣椒样本,采用摩擦接种技术将发现的病毒接种到烟草上,并通过 RT-PCR 方法对该病毒进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感病植株于 2010 年取自黑龙江省哈尔滨市及吉林省九台市辣椒田;分子生物学试剂均由大连宝生物有限公司提供。

第一作者简介:郑敏(1987-),女,在读硕士,研究方向为微生物学。

责任作者:杨洪一(1978-),男,博士,副教授,现主要从事微生物学研究工作。E-mail:hyi01@tom.com

基金项目:教育部博士点基金资助项目(20090062120009);哈尔滨市科技创新人才基金资助项目(RC2008QN002060);黑龙江省教育厅科研资助项目(11541033);博士后落户黑龙江启动基金资助项目。

收稿日期:2012-09-12

1.2 试验方法

1.2.1 引物 根据文献[7]合成 PMMoV 特异性引物 W₁/W₂、W₃/W₄,其序列分别为 5'-ATTTGCCT-TCAAATTGATCCCG-3'、5'-TACATGTGTGACGTG-TATTTGCGA-3'、5'-AGAACTCGGAGTCATCGGAC-3'、5'-GAGTTATCGTACTCGCCACG-3',其中 W₁、W₃ 为上游引物,W₂、W₄ 为下游引物。

1.2.2 PMMoV 粗提纯 取感病辣椒叶片约 5 g,加 15 mL 硼酸缓冲液(Tris-硼酸,pH 8.2,含 0.01 mol/L EDTA,2% PVP,0.5% 巯基乙醇),研磨后纱布过滤,滤液 10 000 r/min 离心 5 min,取上清加 8% PEG,同时加入 NaCl 至终浓度为 0.1 mol/L,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 5 mL 含 2% PVP 的磷酸缓冲液(pH 7.5)溶解。

1.2.3 摩擦接种 取病毒粗提液摩擦接种于健康烟草叶片,对照以磷酸缓冲液接种。

1.2.4 总 RNA 提取 取植物(辣椒或烟草)新鲜叶片,液氮研磨,将粉末转移到加入 490 μ L CTAB(2% CTAB; 100 mmol/L Tris,pH 8.0;20 mmol/L EDTA;1.4 mol/L NaCl)和 10 μ L β -巯基乙醇的 1.5 mL Eppendorf 管中。65℃保温 10~15 min。以 1:1 体积加入氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次。取上清液,加无水乙醇沉淀,去离子水溶解;之后取上清液,以 3 倍体积无水乙醇和 1/10 体积醋酸钠再次沉淀,将沉淀用 30 μ L 去离子水溶解。取 5 μ L 进行电泳检测。

1.2.5 RT-PCR 检测 取 1 μ L RNA 模板,加入 20 μ L 体系:RNA free H₂O 12 μ L,M-MLVE Buffer 4 μ L,oligdT 与 primer9 各 0.5 μ L,dNTPs 0.5 μ L,RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ L,M-MLVE 1 μ L。反应条件为:37℃ 2.5 h,72℃ 15 min。PCR 反应:取反转录模板 1 μ L,加入 25 μ L 反应体系:10 \times Buffer 2 μ L,MgCl₂ 3 μ L,10%甘

油 2 μL , 上下游引物各为 2 μL , dNTPs 0.4 μL , *Taq* 酶 0.15 μL , 加去离子水到 25 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

2 结果与分析

2.1 PMMoV 症状

感病辣椒植株主要表现为叶片褪绿, 并带有黄绿色的小斑点(图 1), 不同时间症状略有不同。摩擦接种烟草后, 烟草叶片出现褪绿、卷曲、畸形等症状(图 2)。



图 1 病毒感染辣椒叶片症状

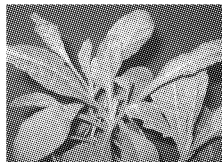


图 2 病毒摩擦接种烟草植株症状

2.2 RT-PCR 检测

利用 CTAB 法, 以辣椒叶片为试材, 提取出辣椒的总 RNA。由图 3 可以看出, 总 RNA 电泳出现 3 条带, 从上往下依次为 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA, 条带清晰, 能满足后续 RT-PCR 反应的需要。

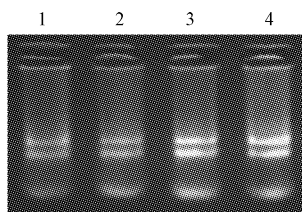


图 3 总 RNA 电泳图

注: 1、2 为辣椒叶片; 3、4 为烟草叶片。

分别以辣椒、烟草叶片为试材, 以提取的总 RNA 为模板, 利用引物 W_1/W_2 、 W_3/W_4 扩增, 由图 4 可知, 扩增出了预期片段(1 045、576 bp)。将此片段进行切胶回收, 连接 PMD-19T 载体, 转化大肠杆菌(JM109)感受态细胞, 挑取阳性克隆子进行测序。经 BLAST 序列搜索显示, 2 对引物扩增序列与 GenBank 中 PMMoV 序列的同源性为 100%。由此确定该病毒为 PMMoV。

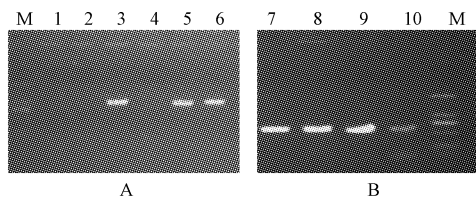


图 4 PMMoV 的 RT-PCR 检测

注: A: 引物 W_1/W_2 扩增结果, 其中 M 为 DL 2000 Marker, 1、2、4 为阴性样品, 3 为感病辣椒叶片 PCR 结果, 5、6 为接种 PMMoV 的烟草叶片 PCR 结果。B: 引物 W_3/W_4 扩增结果, 其中 M 为 DL 2000 Marker, 7、8 为接种 PMMoV 的烟草叶片 PCR 结果, 9、10 为感病辣椒叶片 PCR 结果。

3 结论与讨论

对检测 PMMoV 的 RT-PCR 反应体系进行优化, 最终反应体系为: 反转录体系为 20 μL , 总 RNA 1 μL , RNA free H_2O 12 μL , M-MLVE Buffer 4 μL , oligdT 与 primer9 各 0.5 μL , dNTPs 0.5 μL , RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL , M-MLVE 1 μL 。反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 h, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。PCR 体系为 25 μL , 其中反转录产物 1 μL , 10 \times Buffer 2 μL , MgCl_2 3 μL , 10% 甘油 2 μL , 上下游引物各为 2 μL , dNTPs 0.4 μL , *Taq* 酶 0.15 μL , 加去离子水到 25 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

我国是辣椒主要出口国, PMMoV 是近年来才开始报道的新病害, 目前已报道地区主要包括北京、保定等华北及西北地区。PMMoV 在辣椒叶片上呈现轻微的褪绿或者斑驳症状, 但其症状严重程度易随季节及环境因素变化, 因而较难以通过症状特点对病毒进行鉴定。PMMoV 严重危害辣椒生产, 影响辣椒产量及质量; 此外, 该病毒为种传病毒, 易随辣椒种子调运而快速扩散。

建立快速检测技术是控制 PMMoV 危害的首要问题。RT-PCR 技术具有高度敏感性和特异性, 现以 PMMoV 特异性引物 W_1/W_2 和 W_3/W_4 , 扩增出 2 条 PMMoV 特异性序列, 经克隆测序, 确定该序列为 PMMoV 特异序列。在此基础上, 建立了 PMMoV 的 RT-PCR 检测技术体系。PMMoV 的相关报道主要在华北及华中地区报道较多, 其在东北地区鲜有报道, 该研究在东北地区发现了较多辣椒受病毒病侵染的症状, 经 RT-PCR 鉴定, 确定其病原为 PMMoV, 说明 PMMoV 可能已随种子调运快速扩散至东北地区, 因而有必要加强病毒检测及抗病育种工作。

参考文献

- [1] 向本春, 谢浩. 新疆辣椒轻斑病毒病的分离鉴定[J]. 病毒学报, 1994(10): 240-244.
- [2] 王亚南, 赵绪生, 袁文龙, 等. 辣椒轻斑病毒研究现状[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7401-7402.
- [3] Wang X, Liu F, Zhou G. Detection and molecular characterization of pepper mild mottle virus in China[J]. Journal of Phytopathology, 2005, 154(11/12): 755-757.
- [4] Wang Y, Li X, Liu Y, et al. Development of a simple and effective method for specific detection of Pepper mild mottle virus[J]. Acta virologica, 2009, 53(1): 21-27.
- [5] Velasco L, Janssen D, Ruiz-Garcia L, et al. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper[J]. J Virol Methods, 2002, 106: 135-140.
- [6] Ikegashira Y, Ohki T, Ichiki U T, et al. An immunological system for the detection of pepper mild mottle virus in soil from green pepper fields[J]. Plant Disease, 2004, 88(6): 650-656.
- [7] 郭京泽, 刘鹏, 崔铁军, 等. 辣椒种子中辣椒轻斑病毒病的检测[J]. 检验检疫科学, 2007(6): 32-33.

培养基组分对锦带花粉离体萌发的影响

刘雪莲, 秦佳梅, 孙珺博

(通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002)

摘要:以锦带新鲜花粉为试材,采用正交设计 $L_{16}(4^5)$,研究了蔗糖浓度、钙离子浓度、硼酸浓度对锦带花粉离体萌发的影响,以期筛选出锦带花粉离体萌发的最适宜培养基成分。结果表明:蔗糖浓度和钙离子浓度对花粉萌发和生长影响较大,硼酸的影响不如二者显著。锦带花粉离体萌发最适宜培养基成分为:蔗糖 25%、硼酸 0.016%、钙离子 0.0050%。

关键词:锦带;花粉萌发;培养基成分

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0129-03

锦带(*Diervilla sessilifolia*)为忍冬科落叶直立灌木,花期4~6月,锦带花枝叶茂密,花色艳丽,花期可长达2个多月^[1-2],适宜庭院墙隅、湖畔群植;也可在树丛林缘作花篱、丛植配植;点缀于假山、坡地。锦带属阳性树种,喜光、耐寒、耐旱、怕水涝,对土壤要求不严,是一种很好的园林绿化装饰树种^[3]。近年来,很多学者对观赏植物^[4-6]、果树^[7-8]等的花粉离体萌发研究报道很多,但锦带花粉离体萌发的研究报道较少,该试验以锦带新鲜花粉为试材,采用正交实验方法,研究了其花粉离体萌发的最适培养基成分及其浓度,以期对锦带花粉的生殖生物学研究、植物的品种改良与育种操作、种质库保存提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择通化师范学院校园内新鲜的锦带花粉,于盛花

期上午8:00~10:00采集花粉进行萌发试验。选择当天开放完整、花粉多的花朵,最好在晴天采集。

1.2 试验方法

将加热的培养基均匀地倒在载玻片上,等冷凝后形成厚度均匀的固体培养基,采集当天开放的花朵,将花粉抖落在上述载玻片上的培养基表面,每个载玻片2~3朵花,每个浓度处理重复3次。为防止培养基水分蒸发,将载玻片放入垫有湿润滤纸的培养皿中,每个处理的玻片放入同一个培养皿中,置于25℃条件下培养,2~3 h后用显微镜10×10倍观测花粉萌发率和花粉管长度,以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准,每处理统计约100粒花粉和10个花粉管。试验中每个处理重复3次。试验采用固体培养基(培养基的基础成分:5 g/L琼脂+蒸馏水)。蔗糖设置10%、15%、20%、25% 4个浓度梯度;硼酸设置0.014%、0.016%、0.018%、0.020% 4个浓度梯度;硝酸钙为0.0025%、0.0050%、0.0075%、0.0100% 4个浓度梯度。采用3因素4水平 $L_{16}(4^5)$ 正交实验,各因素和水平见表1。

第一作者简介:刘雪莲(1978-),女,硕士,讲师,现主要从事植物资源多样性保护与利用方面的研究工作。E-mail:liuxuelian1023@163.com.

收稿日期:2012-09-03

Study on Detection of Pepper Mild Mottle Virus by RT-PCR

ZHENG Min¹, GUO Shi-hui¹, ZHANG Na-na¹, YANG Hong-yi^{1,2}

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: A number of peppers infected virus were found by field survey. The virus was inoculated mechanically to tobacco leaves, and the symptoms including mottle and mosaic leaves, could be observed in tobacco. Total RNA, extracted from infected pepper and tobacco with CTAB method, was used as template in RT-PCR with the special primers of pepper mild mottle virus (PMMoV). Expected fragments were obtained and sequenced. It showed that this virus was identified as PMMoV. RT-PCR detection system for PMMoV was established.

Key words: pepper mild mottle virus; inoculate mechanically; RT-PCR