

河南省马铃薯 Y 病毒的分子检测与鉴定

吴兴泉, 陈士华, 陈 涛, 薛 珍, 娄玉华

(河南省谷物资源转化与利用重点实验室, 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 利用 RT-PCR 技术对郑州市和信阳市的马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)进行了鉴定。依据 PVY *pl* 基因序列设计合成 1 对引物, 以带毒的马铃薯叶片总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到 0.58kb 的目的 DNA 片段, 而健康对照无此片段。对 PCR 产物进行序列测定, Blast 分析表明, 该 DNA 序列与 PVY N:O 株系 *pl* 基因序列相似性可达 99%, 证明所得 DNA 片段确为 PVY *pl* 基因, 从而建立了 PVY 的 RT-PCR 检测方法。在此基础上, 从节省检测时间、优化反应程序及反应体系 等方面进行了改进。

关键词: 河南省; 马铃薯 Y 病毒; RT-PCR; 检测与鉴定

中图分类号: S435.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)10-0064-03

The Molecular Detection and Identification of Potato Virus Y in Henan Province

WU Xing quan, CHEN Shi hua, CHEN Tao, XUE Zhen, LOU Yu hua

(The Key Laboratory of Grain Transformation and Utilization of Henan Province, College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Potato virus Y (PVY) can infect potato and do harm to potato seriously. The PVY in Zhengzhou city and Xinyang city of Henan province was detected and identified by RT-PCR molecular detection technology. The specific primers PVYP1 and PVYP2 were designed based on PVY *pl* gene, which amplified a DNA fragment of 0.58kb by RT-PCR using the RNA from the infected plant by PVY as template. However, no DNA fragment was amplified from RNA of healthy potato. The PCR product was sequenced. The results of Blast analysis showed that the similarity of the sequence with the *pl* gene of PVY strain N:O reached to 99%, indicating that the PCR product is the partial DNA fragment of PVY *pl* gene. Then the RT-PCR detection method of PVY was established. The detection method was improved by shortening the reaction time, and optimizing the PCR procedures and PCR reagent system.

Key words: Henan province; Potato virus Y; RT-PCR; Detection and identification

我国是马铃薯生产大国, 马铃薯种植面积和总产量都位居世界第一, 河南省马铃薯种植面积也在不断增加。但单产比世界平均单产低, 单产水平与发达国家相比差距更大^[1]。马铃薯病毒病是马铃薯单产低的重要原因之一。马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)是马铃薯上非常重要的一种病害^[2], 可导致马铃薯退化, 降低产量, 严重时减产可达 80%以上^[3]。在我国由北向南马铃薯带毒率逐渐增高, 造成我国中部和南部地区不能自行留种, 必须

从北部发病轻的地区调种。建立快速、准确的马铃薯病毒检测技术是保证种薯安全调运和种薯成功脱毒的关键, 对马铃薯的有效防治具有重要的现实意义^[4]。

河南省属于中原二季作区, 马铃薯病毒侵害比我国西部和北部地区严重, 而关于河南省马铃薯病毒的危害情况尚未见全面的分析报道^[5]。为明确河南省马铃薯 Y 病毒的发生情况, 建立马铃薯病毒的快速、准确、灵敏、特异的分子检测与鉴定技术, 开展

收稿日期: 2007-07-24

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金项目(2006210003); 河南工业大学校基金项目

作者简介: 吴兴泉(1970-), 男, 黑龙江克山人, 副教授, 博士, 主要从事分子生物学与植物病理学研究。

了本研究。

1 材料和方法

1.1 试剂

植物总 RNA 提取试剂盒 (TianGen), $5\times$ M - MuLV 反转录酶缓冲溶液 (Promega), dNTPs (TianGen), RNasin inhibitor (Promega), M - MuLV 反转录酶 (Promega), $10\times$ Taq Reaction buffer (TianGen), M - M LV RT $5\times$ Buffer (Promega), Taq DNA Polymerase (TianGen), $6\times$ Loading Buffer (TaKaRa), D2000Marker (TianGen), 引物是由大连宝生物有限公司合成, DNA 胶回收试剂盒 (大连宝生物有限公司)。

1.2 马铃薯病毒样本的采集

2007 年 5 月 1 日和 5 月 6 日分别依据马铃薯植株发病症状在郑州市古荥镇和信阳市平桥区采集马铃薯病毒样本。

1.3 PVY RT-PCR 检测方法的建立

1.3.1 植物总 RNA 的提取 使用植物总 RNA 提取试剂盒提取带病马铃薯和健康马铃薯叶片总 RNA, 具体方法依照说明进行。RNA 溶液保存在 -20°C 冰箱中备用。

1.3.2 RT-PCR 扩增 *pl* 基因片段

1.3.2.1 引物的设计与合成 从 Gen Bank 中获得 PVY *pl* 基因全序列, 利用 Clustal 软件分析明确其主要保守性区, 设计引物序列为: 上游引物 PVYP5: $5'-\text{CGATACAAGACTGATGTCC}-3'$ (与 *pl* 基因的第 397bp 至 426bp 间序列同源), 下游引物 PVYP3 序列为: $5'-\text{TTCATGCGATCCACGCACT}-3'$ (与 *pl* 基因第 959bp 至 978bp 间序列互补)。引物的合成在宝赛生物科技有限公司。

1.3.2.2 反转录^[6] 取一 Eppendorf 管, 加入马铃薯总 RNA $5\mu\text{L}$, 引物 PVYP3 $1\mu\text{L}$, ddH₂O $4\mu\text{L}$, 95°C 下变性 10min, 立即取出置于冰上放置 5min。再依次加入: $5\times$ M - MuLV 反转录酶缓冲液 $5\mu\text{L}$, 40 mmol/L dNTPs (每种 10 mmol/L) $1\mu\text{L}$, RNasin (40U/ μL) $1\mu\text{L}$, M - MuLV 反转录酶 (20U/ μL) $1\mu\text{L}$, 加入 DEPC 处理过的 ddH₂O $7\mu\text{L}$ 。将反应混合物于 37°C 水浴 1h, 95°C 灭活 5min, -20°C 保存备用。

1.3.2.3 聚合酶链式反应^[9] 采用 $25\mu\text{L}$ 反应体系进行, 反应混合物包括 cDNA $2.5\mu\text{L}$, 引物各 $2.5\mu\text{L}$, dNTP $1.0\mu\text{L}$, $10\times$ buffer $2.5\mu\text{L}$ (含 MgCl₂), Taq 酶 $0.5\mu\text{L}$, ddH₂O $13.5\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为: 94°C 预变性 10min, 然后 94°C 变性 1min, 37°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 共进行 30 个循环, 然后 72°C 延伸 10min。

1.3.2.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测 取 PCR 产物 $2.5\mu\text{L}$, $6\times$ Loading Buffer (TaKaRa) $1\mu\text{L}$, 琼脂糖凝胶^[11] (凝胶浓度 1.0%, TAE 缓冲体系), 进行电泳分离, EB 染色后, 在长波紫外光下 Bio-RAD 凝胶成像仪采像。

1.3.2.5 序列测定与分析 对所获得的 PCR 产物直接送至北京三博远志生物工程有限公司进行 DNA 序列测定。DNA 序列采用 Blast 和 Clustal X 进行分析。

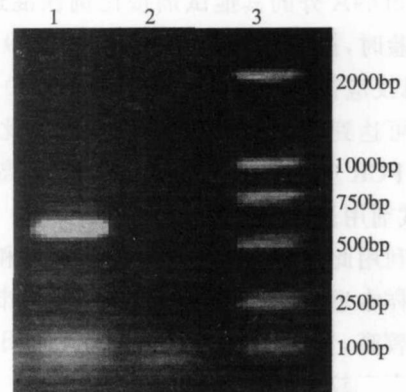
2 结果与分析

2.1 马铃薯病毒样本的采集结果

在郑州市古荥镇和信阳市平桥区马铃薯产地采集 PVY 样本, 发现马铃薯田间病毒病主要有: 矮化、束顶、卷叶、花叶 4 种症状。采集具有明显马铃薯病毒病症状马铃薯叶片带回实验室进行分子鉴定。

2.2 PVY RT-PCR 检测技术的建立

首先对郑州市带病马铃薯样本进行了检测, 以健康马铃薯样本为对照。采用 RT-PCR 法扩增 PVY *pl* 基因中 581bp 长的 cDNA 片段 (图 1)。从图 1 可以看出, RT-PCR 扩增产物与预期大小一致, 而健康对照无此扩增产物。利用上述方法对信阳市马铃薯病毒样本进行检测, 也得到相同结果。证明利用引物 PVYP5, PVYP3 采用 RT-PCR 技术可实现 PVY 的准确鉴定。



1. 带病马铃薯; 2. 健康马铃薯; 3. DL2000 Marker

图 1 RT-PCR 检测马铃薯 Y 病毒

2.3 RT-PCR 扩增产物序列测定与分析

对郑州市和信阳市马铃薯样本中 RT-PCR 扩增产物直接进行序列测定, PVY 郑州分离物 *pl* 基因片段序列如下:

GCGAGGAAGAGAAGAGAGGAATATAATTTCCAAATGGCTGCGTCAAGTGTTGTGTGCGAA
GATCACTATTGCTGGTGGAGAGCCACCTTCAAACTTGAATCACAAGTGCGGAGGGGTGT
CATCCACACAACCTCCAAGGATGCGCACAGCAAAAACATATCACACGCCAAAGTTGACAG
AGGGACAAATGAACCACCTTATCAAGCAGGTGAAGCAAATTATGTCAACCAAAGGAGGG
TCTGTTCAACTGATTAGCAAGAAAAGTACTCATGTTCACTATAAAGAAGTTTTGGGATCA
CATCGCGCAGTTGTTTGCACACTGCACATATGAGAGGTTTACGAAAGAGAGTGGACTTTTCGG
TGTGACAAATGGACCGTTGTGCGTCTACAGCATCTCGCCAGGACGGACAAGTGGACTAAC
CAAGTTCGTGCTACTGATCTACGCAAGGGCGATAGTGGAGTTATATTGAGTAATACTAAT
CTCAAAGGAACTTTGGGAGAAGCTCAGAGGGCCTATTCATAGTGCGTGA

PVY 信阳分离物 *pl* 基因片段序列如下:

CGCGAGGAAGAGAAGAGAGGAATATAATTTCCAAATGGCTGCGCCAAGTGTTGTGTGCGA
AGATCACTATTGCTGGTGGAGAGCCACCTTCAAACTTGAATCACAAGTGCGGAGGGGTG
TCATCCACACAACCTCCAAGGATGCGCACAGCAAAAACCTATCACACGCCAAAGTTGACA
GAGGGACAAATGAACCACCTTACCAAGCAGGTGAAGCAAATTATGTCAACCAAAGGAGG
GTCTGTTCAACTGATTAGCAAGAAAAGCACCTATGTTCACTATAAAGAAGTTTTGGGATC
ACATCGCGCAGTCGTTTGCACACTGCACATATGAGAGGTTTACGAAAGAGAGTGGACTTTTCG
GTGTGATAAATGGACCGTTGTGCGTCTACAGCATCTCGCCAGGACTGACAAGTGGACCAA
CCAAGTTCGTGCTACTGATCTACGCAAGGGCGATAGTGGAGTTATATTGAGTAATACTAA
TCTCAAAGGAACTTTGGGAGAAGCTCGGAGGGCTTATTCATAGTGCGGG

利用 Blast 分析软件分析, 结果表明: PVY 郑州分离物和信阳分离物的 *pl* 基因序列与 PVY N:O 株系的序列相似性均可达到 99%, 说明所得 DNA 片段确为 PVY *pl* 基因。利用此对引物对带毒样本可扩增得到 0.58kb 的 PVY *pl* 基因片段, 而健康马铃薯样本无此片段出现, 因此, 可用于 PVY 的准确检测与鉴定。

2.4 PCR 检测方法的改进与应用

为缩短 PVY RT-PCR 检测技术所需时间及试剂的用量, 对反应程序进行了修改。具体如下: 首先, 将反应循环中的变性时间和退火时间缩短为 30s, 并将循环次数减为 25 次。其次, 将反应循环中的退火由 37℃ 提高到 47℃, 再将 PCR 反应试剂中除 cDNA 外的其他试剂按比例预混进行 PCR 扩增试验时, 按 cDNA : 混合试剂 = 1 : 9 混合取样进行, 总反应体积由通常的 25μL 降至 10μL。上述改进均可达到良好的 PVY 检测效果。此改进措施可节省 PCR 反应时间 40min, 得到了更高的检测特异性, 试剂用量更少, 成本更低。

利用此方法对来自河南省郑州市和信阳市的马铃薯样本进行了检测, 结果表明, 郑州市马铃薯样本带毒较高, 发病率可达 20% 以上, 信阳市马铃薯样本带毒率较低, 在田间仅有零星发生。分析其原因可能是因为信阳市的马铃薯种薯是从黑龙江省引进的, 其种薯带毒非常低, 导致田间发病率也较低。

3 结论

1) 利用引物 PVYP5, PVYP3 通过 RT-PCR

技术可实现 PVY 的准确鉴定。

2) 河南省马铃薯种植区中郑州市马铃薯的 PVY 带毒率高, 信阳市马铃薯带毒率低。

3) 河南省马铃薯所感染的 PVY 与 PVY N:O 的基因序列相似性极高, 说明该病毒应为 PVY N 株系^[7]。

4) 采用优化的 PCR 反应方案可实现 PVY 的快速、准确检测, 且成本低廉。

参考文献:

- [1] 魏延安. 世界马铃薯产业发展现状及特点[J]. 世界农业, 2005(3): 29-32.
- [2] 谢联辉, 林奇英, 吴祖建. 植物病毒名称及其归属[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 137-142.
- [3] Hooker W J. 马铃薯病害及其防治[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992: 129-131.
- [4] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 分子生物学技术在马铃薯病毒检测中的应用[J]. 中国马铃薯, 2003(3): 175-179.
- [5] 高凯, 赵爱菊, 刘忠玲, 等. 洛阳市马铃薯二季作区病毒侵袭状况调查[J]. 河南农业科学, 2002(9): 33-34.
- [6] 吴兴泉. 福建马铃薯病毒的分子鉴定与检测技术[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- [7] Weilguny H, Singh R P. Separation of Slovenian isolates of PVY (NTN) from the North American isolates of PVY(N) by a 3 primer PCR[J]. J Virol Methods 1998, 71(1): 57-68.