

应用多重 RT-PCR 检测百合无症病毒和百合斑驳病毒

王继华¹ 王丽花¹ 丁元明² 瞿素萍¹ 熊 丽¹ 唐开学^{1*}

(¹ 云南省农业科学院农业部花卉产品质检中心, 昆明 650205; ² 云南出入境检验检疫局, 昆明 650228)

摘 要: 根据病毒外壳蛋白基因序列, 设计了 2 对检测百合无症病毒 (LSV)、百合斑驳病毒 (LMoV) 的引物, 对扩增条件进行优化, 建立了同时检测 LSV 和 LMoV 的多重 RT-PCR 检测方法。此方法可特异地从带有 LSV 和 LMoV 的样品中扩增出 2 条带 LSV (876 bp)、LMoV (662 bp)。灵敏性测定结果表明, 该双重 PCR 可从稀释 10^4 组织中检测出病毒, 具有与单一 PCR 相同的灵敏性。扩增产物测序表明, LSV 扩增产物与其它分离物核苷酸同源性为 87.8% ~ 99.3%, LMoV 扩增产物与其它分离物的同源性为 90.1% ~ 99.5%。

关键词: 多重 PCR; 检测; 百合无症病毒; 百合斑驳病毒

中图分类号: S 682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 02-0284-04

Detection of Lily symptomless virus and Lily mottle virus by Multiplex RT-PCR

Wang Jihua¹, Wang Lihua¹, Ding Yuanming², Qu Suping¹, Xiong Li¹, and Tang Kaixue^{1*}

(¹ Yunnan Agriculture Academy, Supervision and Testing Centre for Flower of Agriculture Ministry, Kunming 650205, China;

² Yunnan Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau, Kunming 650228, China)

Abstract: Two sets of specific primers were designed according to LSV and LMoV CP gene sequence, and the conditions for PCR were optimized. The multiplex PCR method which can simultaneously detect the two lily viruses was developed. It was showed that all samples which infected LSV and LMoV could be amplified by multiplex PCR, yielding two specific bands of LSV (876 bp) and LMoV (662 bp). The two viruses were detected from dilutions of 10^4 by multiplex RT-PCR and RT-PCR, respectively. Sequence analysis on the amplified products show that the nucleotide sequences homology of LSV was 87.8% ~ 99.3% compared with sequences of other isolates, and LMoV was 90.1% ~ 99.5%.

Key words: Multiplex PCR; Detection; Lily symptomless virus; Lily mottle virus

病毒病是百合鲜切花生产中的主要病害。在我国病毒病的发病率一般在 30% ~ 50%, 严重的达 80% 以上, 造成了较大的经济损失。目前国内外已报道侵染百合的病毒有 10 种以上^[1,2]。其中为害最严重的有两种, 即百合无症病毒 (Lily symptomless virus, LSV) 和百合斑驳病毒 (Lily mottle virus, LMoV), 这两种病毒表现为复合侵染, 常造成产量和质量的严重下降^[3~5]。

由于百合种球主要通过组培和鳞片扦插等技术进行无性繁殖, 从而加快了百合病毒的传播和为害。防治百合病毒病最有效手段是采用无毒繁殖材料或进行脱毒快繁, 而这有赖于灵敏、快速和可靠的病毒检测技术^[6]。当前, 国内检测百合病毒的方法主要有 ELISA、电镜和 PCR 技术^[7~9]。为提高 PCR 检测效率和降低成本, 本研究在前期工作基础上^[8,9], 建立可同时检测 LSV、LMoV 的复合 PCR 技术, 以运用于百合主要病毒的检测、脱毒组培快繁和百合病毒流行规律的研究。

1 材料与方法

收稿日期: 2004 - 07 - 14; 修回日期: 2004 - 11 - 01

基金项目: 云南省科技攻关项目 (2004NG08)

* 通讯作者 Author for correspondence

1.1 材料

在斗南园艺场温室中采集具典型病毒症状的百合植株，经 ELISA 和电子显微镜检测，获得分别带有 LSV、LMoV 的样品，及两种病毒复合侵染的样品，活体保存。

1.2 方法

根据 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 登记的 LSV、LMoV CP 基因序列，应用计算机软件，设计这两种病毒的特异引物 LSVCP1/LSVCP2 和 LMoV 检测引物 LMoVP1/LMoVP2，引物核酸序列见表 1。引物由大连宝生物公司合成。

表 1 LSV 和 LMoV 引物序列

Table 1 Sequence of LSV and LMoV primers

病毒 Viruses	上游引物 Up primer(5'-3')	下游引物 Down primer(5'-3')	产物大小 Product size (bp)
LSV	LSVCP1: ATGCAACCAAGACCAGCACA	LSVCP2: TCA TCCATTATTTGCGTATC	876
LMoV	LMoVP1: TGGGCACCTTGTGAATTACA	LMoVP2: TGCTGTATGCCTCTCCGTGT	552

采用上海华舜公司的 RNA 抽提试剂盒 RNAex Reagent System M 提取总 RNA。将 0.05 g 植物组织在 1 mL 缓冲液中研磨，其它步骤按说明书操作。提取的总 RNA 溶解于 50 μ L 的 ddH₂O 中。

采用 5 \times MMLV 缓冲液 4 μ L，10 mmol/L dNTPs 1 μ L，20 μ mol/ μ L Random primers (Promega) 0.5 μ L，2 μ L 模板 RNA，40 U/ μ L RNase 0.5 μ L，200 U/ μ L M-MLV 反转录酶 1 μ L，加 ddH₂O 补足至总体积 20 μ L。混合后 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h，合成 cDNA^[10]。

对多重 PCR 的各引物浓度及 PCR 反应的退火温度进行优化，筛选出多重 PCR 反应体系的最佳反应模式。

将带有 LSV、LMoV、LSV + LMoV 的百合叶片、百合健康叶片，分别进行多重 PCR 扩增，3 次重复，以检测其特异性。

用 LSV + LMoV 复合侵染的百合叶片提取总 RNA，稀释为 $10^1 \sim 10^8$ (分别相当于 200 μ g、20 μ g、2 μ g、200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg) 后，分别进行 LSV、LMoV 引物和多重 PCR 扩增，3 次重复，以检测多重 PCR 的灵敏度。

RT-PCR 扩增产物经 QIAEX GelExtractionKit (QIAGEN 公司产品) 纯化后，与 pGEM-Teasy 载体 (Promega 公司产品) 连接，转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞，利用 PCR 技术和酶切进行筛选阳性克隆。DNA 测序由宝生物工程有限公司完成。用 DNASIS 软件对所测 DNA 序列进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 反应条件的优化

经对多重 PCR 的优化，最佳的反应模式为：在 50 μ L 反应体系中，分别加入 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L，10 mmol/L dNTPs 1 μ L，20 μ mol/ μ L LSV 上下游引物各 1 μ L，LMoV 上下游引物各 1.1 μ L，5 μ L cDNA，3 U/ μ L Taq 酶 1 μ L，加 ddH₂O 至 50 μ L。递减式 PCR 程序：95 $^{\circ}$ C 变性 10 min。前 10 次循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，退火 (每循环降 1 $^{\circ}$ C，从 64 $^{\circ}$ C 降至 54 $^{\circ}$ C) 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s。后 20 次循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，53 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2.2 多重 PCR 的特异性

多重 PCR 可从分别带有 LSV、LMoV 病毒的

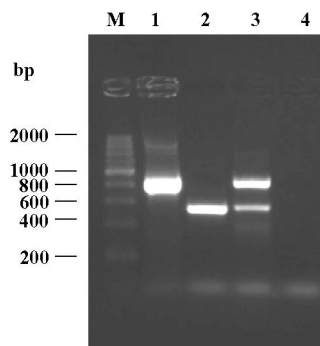


图 1 多重 PCR 的特异扩增

M: 200 bp 分子量标准; 1: LSV; 2: LMoV; 3: LSV + LMoV; 4: 健康叶片。

Fig. 1 Specific amplified by multiplex PCR

M: 200 bp Marker; 1: LSV; 2: LMoV; 3: LSV + LMoV; 4: Health leaf

叶片组织中扩增出单一的 PCR 产物, 大小分别为 876 bp、552 bp, LSV 和 LMoV 复合感染的叶片组织则可扩出两条 PCR 产物, 健康叶片则无扩增产物 (图 1)。这说明复合 PCR 具有较高的特异性, 可准确地检测出百合叶片中的这两种病毒。

2.3 多重 PCR 的灵敏度比较

LSV、LMoV 单一引物扩增和多重 PCR 的检测灵敏度比较结果表明: 用 LSV 或 LMoV 的单对引物, 可从稀释至 10^4 (相当于 200 ng) 的粗提液中扩增出 876 bp (图 2, A) 或 552 bp (图 2, B) 的产物; 用多重 PCR 方法, 可从稀释至 10^4 的总 RNA 中同时扩增出 876 bp 和 552 bp 两条特异扩增带 (图 2, C)。这表明多重 PCR 方法具有与单对引物 PCR 相同的检测灵敏度。

2.4 PCR 产物序列分析

测序表明, LSV 扩增产物共有 876 个核苷酸组成, 与设计的 PCR 产物大小相同, 为 LSV CP 基因的全长。经序列比较, 与 LSV 荷兰分离物和韩国分离物同源性大于 98%, 与日本分离物核苷酸同源性大于 87%。LMoV 的 PCR 产物核苷酸序列全长 553 bp, 与设计的 PCR 产物大小相同。经序列比较, 证实扩增产物为 LMoV CP 基因部份序列, 与其它 5 个 LMoV 分离物的同源性为 90.1% ~ 99.5%。以上结果表明, 扩增产物与其它分离物有较高核苷酸同源性, 证明了多重 PCR 检测结果的可靠性 (LSV CP 基因序列 NCB I 登录号 AY326460)。

3 讨论

3.1 采用多重 PCR 检测植物病毒, 在国内鲜有报道。本研究建立的百合两种病毒的多重 PCR 检测技术, 比常规 PCR 方法简化了程序, 节约生物试剂, 具有与常规 PCR 相同的特异性和灵敏度, 整个过程可在 6~7 h 内完成。此外, 通过与前期研究^[8]比较, 多重 PCR 的灵敏度是 DAS-ELISA 的 10 倍以上。本研究对复合病毒的多重 PCR 检测有一定的指导意义, 目前已应用于百合脱毒种苗的日常检测。

3.2 前期试验表明, 影响多重 PCR 的主要因素包括: 每对引物扩增片段大小、退火温度和引物浓度, 而 PCR 各步骤的时间和循环次数相对固定, 对结果影响较小。根据多重 PCR 反应较小片段优先扩增的原则, 本试验所设计的 2 个扩增片段分别为 876 bp (LSV) 和 552 bp (LMoV), 片段之间大小相差约 300 bp, 既有利于区分产物, 也有利于每对引物的扩增。由于两对引物所要求最佳退火温度不同, 因此本试验采用了降落 (TD) PCR, 同时对引物浓度进行了优化, 从试验结果可以看出, 两对引物均能获得较佳的多重 PCR 扩增效果, 即有较好的特异性和较高产量。

参考文献:

- 1 Ki Hyun Ryu, Hye Won Park, Jang Kyung Choi Characterization and sequence analysis of a lily isolate of cucurbit mosaic virus from liliun tsingtauense. Plant pathol J., 2002, 18 (2): 85~92
- 2 沈淑琳. 百合病毒病及其检验. 植物检疫, 1996, 10 (4): 223~226
Shen S L. Lily virus disease and detection. Plant Quarantine, 1996, 10 (4): 223~226 (in Chinese)
- 3 Kim J, Lee S, Kim H, Choi S, Mark S Roh Survey on virus diseases of *Lilium* spp. and their indexing by tissue and dot immunobinding assays. Acta Horticulturae, 1996, 414: 189~194

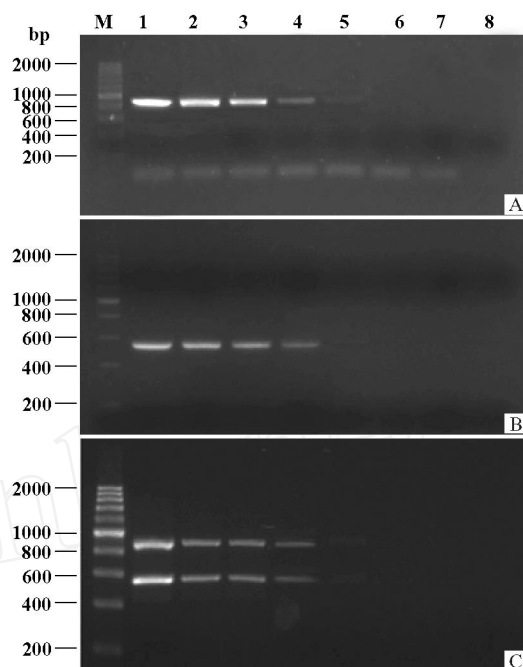


图 2 RT-PCR 和 Multiplex RT-PCR 灵敏度比较

M: 200 bp 分子量标准; 1~8: 稀释度分别为 $10^1 \sim 10^8$ 。

Fig. 2 Sensitive comparison between RT-PCR and Multiplex RT-PCR

M: 200 bp Marker; 1-8: Dilutions from $10^1 - 10^8$.

- 4 Asjes C J, Blom-Bamhoom G J, Piron P G M, Harrewijn P, van Oosten A M. Control review of air-borne tulip breaking virus and lily symptomless virus in *Lilium* in the Netherlands. *Acta Horticulturae*, 1996, 432: 290 ~ 297
- 5 Cohen J, Gera A, Loebenstein G. Virus diseases of lilies in Israel. *Acta Horticulturae*, 1996, 432: 84 ~ 87
- 6 徐品三, 苏乔, 安利佳. 百合不定芽培养脱毒初探. *园艺学报*, 2003, 30 (5): 597
Xu P S, Su Q, An L J. Preliminary study on virus-free by adventitious bud culture in *Lilium* spp. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30 (5): 597 (in Chinese)
- 7 Yang T C, Lin C Y, Zettler F W, Ko N J. Identification and diagnosis of lily symptomless virus in commercial lilies grown in Taiwan and USA. *Plant Prot Bull*, 1993, 35 (2): 95 ~ 103
- 8 王继华, 瞿素萍, 孔宝华, 陆琳, 余朝秀. 百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测. *云南农业大学学报*, 2004, 19 (1): 148 ~ 150
Wang J H, Qu S P, Kong B H, Lu L, Yu C X. Detection of *Lily symptomless virus* by RT-PCR and IC-RT-PCR. *Journal of Yunnan Agriculture University*, 2004, 19 (1): 148 ~ 150 (in Chinese)
- 9 丁元明, 王继华, 刘忠善, 和捷. 应用特导引物和简并引物检测百合花叶病毒. *云南农业大学学报*, 2003, 18 (4): 96
Ding Y M, Wang J H, Lu Z S, He J. Detection of *Lily mottle virus* by RT-PCR using special primers and degenerate primers. *Journal of Yunnan Agriculture University*, 2003, 18 (4): 96 (in Chinese)
- 10 王继华, 丁元明, 王丽花. 百合无症病毒云南分离物的 CP 基因克隆和序列分析. *植物病理学报*, 2003, 33 (6): 562 ~ 563
Wang J H, Ding Y M, Wang L H. The cloning and sequences analysis of CP gene of Yunnan isolates of *Lily symptomless virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33 (6): 562 ~ 563 (in Chinese)

日光温室嫁接番茄生长特性及抗病性研究

关美芝¹ 范双喜^{1*} 王绍辉¹ 秦勇² 高洁² (¹北京农学院植物科学技术系, 北京 102206;
²新疆农业大学园艺系, 乌鲁木齐 830001)

Effect of Different Root Stocks on the Growth Characteristics and Resistance to Disease of Tomato Growing under Solar Greenhouse

Guan Meizhi¹, Fan Shuangxi^{1*}, Wang Shaohui¹, Qin Yong², and Gao Jie² (¹Department of Plant Science and Technology, Beijing Agriculture College, Beijing 102206, China; ²College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830001, China)

关键词: 番茄; 嫁接; 抗病性

中图分类号: S 641.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 02-0287-01

近年来, 由于设施蔬菜生产的高复加值, 使得连作障碍严重, 土传病害广泛蔓延。有关嫁接栽培早结果、丰产、增强植株抗性报道较多。但嫁接对番茄生长特性及抗病性影响的研究报道较少。本试验旨在选择早产、高产、抗病性砧木, 为设施蔬菜无公害生产提供科学的理论依据和指导方向。

试材番茄自根苗 '日本满田 2170' 于 2003 年 11 月 21 日播种, 4 种砧木 (粘毛茄、北农茄砧、拖鲁巴姆、赤茄) 于 2003 年 10 月 26 日统一播种。当砧木生长为四叶一心、接穗二叶一心时采用劈接法嫁接。3 月 8 日统一定植于北京农学院日光温室, 常规栽培管理。2004 年 2 月 18 日嫁接后采用小拱棚遮阴管理, 棚内温度为 25 ~ 28℃, 相对湿度 95%。不同砧木嫁接番茄每小区定植 22 株, 两区共定植 44 株。记录嫁接番茄第 1 花序 50% 开花时间和果实 10% ~ 20% 转红的时间。观察晚疫病自然病害发生情况并进行测产。

试验结果 (表 1) 表明番茄嫁接后, 第 1 花序 50% 开花所需天数和果实 10% ~ 20% 转红所需天数早于自根苗, 其中嫁接成活率高的番茄, 开花结果早, 产量高、抵抗晚疫病能力较强; 嫁接成活率低的番茄则相反。如粘毛茄的嫁接成活率较高, 与自根苗相比, 开花、果实转红分别早 25 d 和 26 d, 产量高 14%、晚疫病感病率较低。北农茄砧的嫁接成活率较低, 与自根苗相比, 开花、结果转红提前 14 d 和 13 d, 产量低 35%, 抵抗病害的能力也较低为 20%。从整体上看, 说明嫁接番茄的初花期和初果期比自根苗较提前, 生产上能较早得到经济效益。在 4 种砧木中以粘毛茄为早产、高产、抗性强的优良砧木品种。

表 1 嫁接对番茄生长特性及抗病性的影响

Table 1 Effect of different root stocks on the growth characteristic and resistance disease of tomato

处理 Treatment	成活率 Survival rate (%)	开花天数 Days from grow to first flower	果转红天数 Days from grow to fruit turn red	晚疫病发病率 Disease rate (%)	产量 Yield (kg/m ²)
自根苗 Rootself	45	95	14	50	
粘毛茄 Nianmaoqie	63	20	69	9	59
赤茄 Chi-qie	43	26	72	14	36
拖鲁巴姆 Tuolubamu	56	28	73	18	39
北农茄砧 Beinongqiezhenn	38	31	82	20	32

收稿日期: 2005 - 01 - 20; 修回日期: 2005 - 03 - 29

基金项目: 北京市科技新星资助项目 (2004B13)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fsx20@163.com)