

进境唐菖蒲种球南芥菜花叶病毒分子鉴定

秦绍钊^{1,2}, 丁元明^{1*}, 王云月², 寸东义¹, 刘忠善¹, 李春燕²

(¹云南省出入境检验检疫局, 昆明 650228; ²云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201)

Molecular identification of *Arabis mosaic virus* from imported *Gladiolus hybridus*
QIN Shao-zhao^{1,2}, DING Yuan-ming¹, WANG Yun-yue², CUN Dong-yi¹, LIU Zhong-shan¹, LI Chun-yan²
(¹Yunnan Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China; ²College of Plant Protection, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Arabis mosaic virus* (ArMV) had been found in the *Gladiolus hybridus* imported from the Netherlands by DAS-ELISA. Two pairs of primers were designed according to the conserved region of the coat protein (CP) gene sequence of *Arabis mosaic virus* (ArMV), and two amplified bands with expected sizes of 750 bp and 250 bp were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The sensitivity of nested PCR was higher than that of single RT-PCR. Analysis of the partial sequenced CP gene showed that the isolate was closed to ArMV with similarity of 99.0% - 100%. All the results demonstrated that the isolated virus was ArMV.

Key words: *Arabis mosaic virus*; RT-PCR; nested PCR

文章编号: 0412-0914(2008)02-0215-04

南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)是为害花卉、树木和蔬菜等经济作物的重要病毒, 2007 年进境检疫新名录将该病毒列入检疫性有害生物, 依法对其实施检疫。南芥菜花叶病毒是一种极易传播和蔓延的病毒, 属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)成员, 病毒粒体为等径多面球体, 直径约 30 nm, 为二分体病毒^[1]。

ArMV 主要分布于日本、瑞典、丹麦、挪威、芬兰、奥地利、波兰、捷克、瑞士、比利时、德国、荷兰、法国、英国、爱尔兰、新西兰等国家, 在我国田间尚未发现。ArMV 寄主范围广泛, 可以侵染约 174 属 215 种植物, 自然侵染并危害多种瓜类、豆类、花卉和果树, 引起花叶、黄化褪绿、矮化、皱缩甚至坏死等症状^[1]。ArMV 可以经种子、汁液、嫁接、机械、

菟丝子以及介体线虫传播。介体传播主要为剑线虫属(*Xiphinema*)的异尾剑线虫(*Xiphinema diversicaudatum*), 长针线虫属(*Longidorus*)的 *Longidorus macrosoma*。病毒在线虫体内可保毒约 12 d, 线虫传毒可进入苋色藜及矮牵牛叶片的韧皮部细胞^[1]。

目前, 国内外针对 ArMV 的检疫所使用的方法, 包括鉴别寄主反应(生物学方法)、电镜观察、血清学试验和核酸杂交、PCR 检测等分子生物学手段^[1~5]。PCR 扩增技术作为一种快速、灵敏和有效的检测方法, 具有其他检测方法无法比拟的优点, 在植物病毒的检验检疫中具有广阔应用前景。国内还未见 ArMV 的巢式 PCR 研究报道, 本研究根据 GenBank 已公布的 ArMV 序列的保守区设计引物, 建立了 ArMV 的巢式 PCR 的检测方法。

收稿日期: 2007-08-15; 修回日期: 2007-11-21

基金项目: 云南省检验检疫科技公关项目(2006CIQ009-02)

通讯作者: 丁元明, 男, 研究员, 研究方向为植物病毒病害及其检验检疫; E-mail: ymdingciq@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2006 年 10 月荷兰进境的唐菖蒲种球,本实验室保存南芥菜花叶病毒带毒植株。

1.2 试验试剂

本研究所用的反转录酶 (AMV)、*Taq* 酶、dNTPs 和 pMD 18-T Vector 均购于宝生物工程(大连)有限公司。DNA 片段纯化试剂盒等均购于上海华瞬有限公司。ArMV 抗血清购自美国 Agdia 公司。

1.3 引物设计

根据 NCBI 上 GenBank 中已公布的 ArMV CP 基因 (登录号: D10086、AB2797741、X81814、X55460 和 X81815) 的保守序列,设计 2 对特异性引物 I (AF1/AR1) 和 II (AF2/AR2),由宝生物工程(大连)有限公司合成。AF1: 5'-TGCGCAGCT-GATTGAGAGTCTG-3', AR1: 5'-GTAGCATAAT-GATTGTCTCAGG-3', AF2: 5'-GCACTGCGTAC-TAGACTGAGTC-3', AR2: 5'-ATGGTGCCAGTT-GTTAGTGACC-3'。

1.4 RNA 提取和反转录

将 100 mg 的带毒唐菖蒲叶片用液氮研磨后,用大连宝生物的 RNAiso Reagent 试剂提取样品叶片总 RNA。反转录体系 20 μ L: DEPC- H_2O 10 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 20 μ mol/L 引物 (AR1) 2 μ L, RNA 模板 1 μ L, AMV 酶 5 \times buffer 4 μ L, AMV RT 酶 1 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L。反应程序:室温 10 min, 42 $^{\circ}C$ 1 h。

1.5 RT-PCR 和巢式 PCR

普通 RT-PCR 以 AF1/AR1 为引物扩增;巢式 PCR 分别以 AF1/AR1 为外引物, AF1/AR2、AF2/AR1 和 AF2/AR2 为内引物扩增, AF1/AR2 扩增的产物命名为 KMS5958。

PCR 反应体系均为 50 μ L: 10 \times buffer 5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 3 μ L, dNTPs (25 mmol/L) 1 μ L, *Taq* 酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L, 上游引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 4 μ L, H_2O 34.5 μ L。

反应程序: 94 $^{\circ}C$ 6 min; 94 $^{\circ}C$ 50 s, 58 $^{\circ}C$ 40 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min。取扩增产物 10 μ L, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 15 min, 紫外灯下观察。

为了检测巢式 PCR 检测 ArMV 的灵敏度, 将合成的 cDNA 分别按 5、10、20、40、80 和 160 倍稀释, 取稀释后的 cDNA 为模板, 利用引物 AF1/AR1 进行第 1 轮 PCR 扩增。取第 1 轮 PCR 产物各 2 μ L 作为模板, 利用引物 AF1/AR2 进行第 2 轮 PCR 扩增, 同时以稀释 20 倍的 cDNA 为模板, 利用引物 AF1/AR2 进行第 1 轮 PCR 扩增, 将 AF1/AR2 为引物两次 PCR 扩增的产物进行比较。

1.6 PCR 产物的克隆、测序

利用上海华瞬有限公司 DNA 片段纯化试剂盒回收 PCR 产物, 即分离物 KMS5958, 连接到 pMD18-T 载体上, 并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 经蓝白斑筛选阳性菌落, 所得重组质粒经酶切鉴定后, 送大连宝生物公司测序。

2 结果与分析

2.1 ArMV 的普通 RT-PCR 和巢式 PCR 检测

根据已报道的 ArMV CP 基因的保守序列设计了 2 对特异性引物 I (AF1/AR1) 和 II (AF2/AR2), 预期扩增大小分别为 750 bp 和 250 bp。普通 PCR 样品中扩增出约 750 bp 的 DNA 片段, 与根据引物设计的片段大小一致, 而健康植株组织中未扩增出任何条带 (图 1), 巢式 PCR 引物 I 扩增得到片段大小同普通 PCR 的一致, 3 对内引物 AF1/AR2、AF2/AR1 和 AF2/AR2 扩增分别得到 570 bp、330 bp 和 250 bp 的 DNA 片段 (图 2)。引物 AF1/AR1、AF1/AR2 和 AF2/AR1 扩增产物的亮度和特异性比较好。

2.2 ArMV 的普通 RT-PCR 和巢式 PCR 灵敏度比较

为了进一步提高 PCR 方法检测 ArMV 的灵敏度和特异性, 用引物 AF1/AR2 进行第一轮 PCR 扩增, 然后以第 1 轮 PCR 产物为模板进行第二次 PCR 扩增, 建立了 ArMV 的巢式 PCR 检测方法。以巢式 PCR 方法对带毒样品进行检测, 进一步验证巢式 PCR 检测 ArMV 的灵敏度。结果发现将

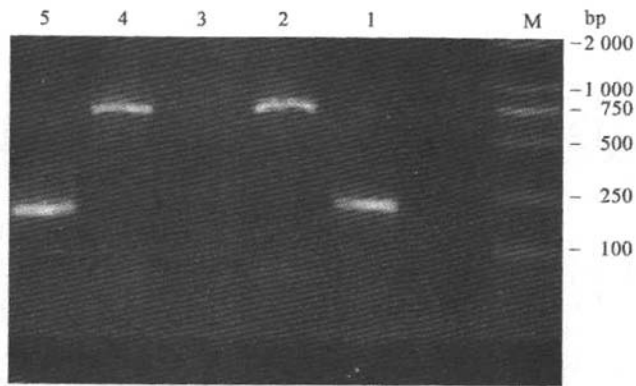


Fig. 1 Detection of *Arabis mosaic virus* by RT-PCR

1-2; Positive control; 3; Negative control; 4; Primer pairs I; 5; Primer pairs II; M; DL 2000 marker.

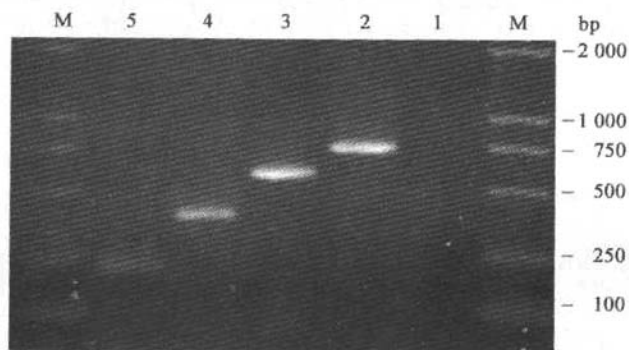


Fig. 2 Detection of *Arabis mosaic virus* by nested PCR

1; CK; 2,5; Amplified product from first round of PCR; 3,4; Amplified product from second PCR round of PCR; M; DL2000 marker.

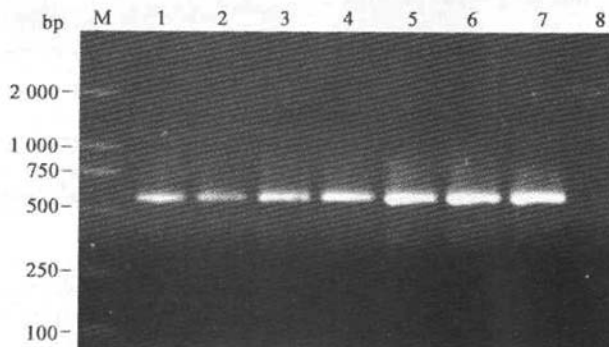


Fig. 3 Sensitivity of nested PCR to detection for *Arabis mosaic virus*

1; Amplification plot of dilution of cDNA 20 times by RT-PCR using primer pairs;
2-7; Amplification of different dilution of cDNA including 160,80,40,20,10 and 5 times by nested PCR;8; CK.

cDNA 稀释 5 ~ 20 倍时,巢式 PCR 扩增条带的亮度没有明显变化,此后随着稀释倍数的增加,DNA 条带逐渐变暗,将 cDNA 稀释 160 倍时巢式 PCR 扩增后琼脂糖电泳检测到 DNA 条带亮度最弱。与巢式 PCR 相比,用引物 AF1/AR2 进行普通 RT-PCR,当 cDNA 稀释 20 倍时 PCR 扩增后检测到的 DNA 条带亮度比较弱,表明本研究所建立的巢式 PCR 检测方法检测 ArMV 的灵敏度比普通 RT-PCR 高。

2.3 序列分析

巢式 PCR 扩增产物 KMS5958 (AF1/AR2 为引物)序列测定结果表明,与 ArMV 的序列同源性最高,为 ArMV CP 基因的部分序列。利用 DAN-MAN 软件进一步序列比对表明,分离物 KMS5958 与 GenBank 中已经登录的 ArMV 序列 D10086.1、AB2797741.1、AY017339.1、X81814.1、X55460.1 和 X81815.1 在核苷酸和氨基酸水平上具有最高的同源性,核苷酸水平上的同源性分别为 99.0% ~ 100%,表明分离物 KMS5958 为 ArMV 的一个分离物。

3 讨论

本研究根据 GenBank 中公布的 ArMV 分离物序列的保守区域设计引物,分别建立了 ArMV 的普通 RT-PCR 和巢式 PCR 检测方法,序列分析证实所建立的 ArMV 检测方法是可靠的。普通 RT-PCR 在对病毒检测的特异性和敏感性方面都得到了很大的提高,在一定程度上可以降低血清学检测时假阳性可能性,但对 ArMV 含量较低的样品进行检测,其灵敏性低于巢式 PCR,并且在进行大量样品检测的试验过程中仍存在易污染的问题。花卉植物中 ArMV 的含量低且其中的多糖和酚类化合物含量较高,这些物质会影响 RNA 的提取并对 RT-PCR 过程产生抑制作用,使得普通 RT-PCR 检测易出现漏检现象。本研究采用反转录巢式 PCR 方法对唐菖蒲样品进行检测,通过两对引物进行两次扩增,提高了检测的灵敏度,一定程度上克服了假阴性的问题,同时也提高了 PCR 的灵敏度和特异性,但是在灵敏度和定量方面的研究还有

很多不足。因而,作者认为对于花卉植物中 ArMV 的检测除改进 RNA 提取方法,保证能够得到高质量的 RNA 外,建立诸如巢式 PCR 和荧光定量 PCR 等较为简便、灵敏、特异的检测方法是十分必要的。

我国每年都要从国外进口大量鲜切花的种苗和种球,但是这些植物产品同时也会携带一些有害生物,我们应该积极应对,严格把关,必须加强对新的危险性有害生物检测、鉴定方法的研究,尽快在各口岸实验室推广,防止有害生物的传入。近年来,进口植物、植物产品因携带各种危险性有害生物而被我国口岸出入境检验检疫部门销毁、退货的情况很多。ArMV 是可以经种子、汁液、嫁接、机械、菟丝子以及介体线虫传播的高风险检疫性有害生物,为防止该病毒传入我国,建立有效的检测方法十分重要。植物病毒检测既是我国口岸植物检疫的重点,也是难点。因此,尽快建立植物病毒快速和准确的检测方法,不仅为我国花卉等产业提供安全生产保障,同时也为相关的国际贸易谈判提供有力的支持。

参考文献

- [1] Zhang Y C, Chen X B, Jiao H Y. *Arabis mosaic virus* (in Chinese) [J]. *Plant Quarantine*, 1994, 8(5): 284 - 285.
- [2] Bertolini E, Olmos A, Martinez M C, *et al.* Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees [J]. *J. Virol. Methods*, 2001, 96(1): 33 - 41.
- [3] Wetzel T, Beck A, Wegener U, *et al.* Complete nucleotide sequence of the RNA1 of a grapevine isolate of *Arabis mosaic virus* [J]. *Arch. Virol.*, 2004, 149(5): 989 - 995.
- [4] Wetzel T, Fuchs M, Bobko M, *et al.* Size and sequence variability of the *Arabis mosaic virus* protein 2A [J]. *Arch. Virol.*, 2002, 147(8): 1643 - 1653.
- [5] Kulshrestha S, Hallan V, Raikhy G, *et al.* Reverse transcription polymerase chain reaction-based detection of *Arabis mosaic virus* and *Strawberry latent ringspot virus* in vector nematodes [J]. *Research Communications*, 2005, 89(10): 1759 - 1762.