

侵染甘薯的菜豆金色花叶病毒属病毒和甘薯褪绿矮化病毒多重PCR检测方法的建立与应用

Development and application of multiplex PCR method for detection of sweepoviruses and *Sweet potato chlootic stunt virus* in sweet potato

王 爽 田雨婷 乔 奇 秦艳红 张德胜 张振臣*

(河南省农业科学院植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防治重点实验室,
农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室, 郑州 450002)

Wang Shuang Tian Yuting Qiao Qi Qin Yanhong Zhang Desheng Zhang Zhenchen*

(Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, IPM Key Laboratory in Southern Part of North China of Ministry of Agriculture,
Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 病毒属于双生病毒科, 可侵染多种植物, 侵染甘薯的菜豆金色花叶病毒属病毒与侵染其它植物的病毒明显不同, 因此, 把侵染甘薯的菜豆金色花叶病毒属病毒统称为 sweepoviruses (Fauquet & Stanley, 2003)。甘薯褪绿矮化病毒 (*Sweet potato chlootic stunt virus*, SPCSV) 属于长线形病毒科毛形病毒属 *Crinivirus* (Kreuze et al., 2002)。SPCSV 和 sweepoviruses 是侵染甘薯的 2 类重要病毒, 严重影响甘薯产量。目前, 检测 SPCSV 方法包括血清学检测方法和 RT-PCR 方法等 (张盼等, 2013), 检测 sweepoviruses 方法主要包括 PCR 方法和 RCA 方法。这些方法均存在一些不足, 本研究拟建立同时检测甘薯中 SPCSV 和 sweepoviruses 的多重 PCR 方法, 以期提高检测效率, 为甘薯病毒的预警和防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试薯块: 从田间采集发病薯块, 选取含有 SPCSV 和 sweepoviruses 的薯块及含甘薯羽状斑驳病毒 (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) 而不含 SPCSV 和 sweepoviruses 的薯块, 共 16 份。

试剂及仪器: PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; 植物总 RNA 提取试剂盒, GeneMark 生物科技有限公司; 植物 DNA 提取试剂盒, 美国 OMEGA 公司; SPCSV 病毒重组质粒(含 SPCSV CP 基因)、sweepoviruses 病毒重组质粒(含甘薯四川曲叶病毒 2 (*Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2*, SPLCSiV-2) 的全长基因组序

列), 河南省农业科学院植物保护研究所构建保存。Biometra GmbH PCR 仪, 德国 Analytik Jean 公司。

1.2 方法

根据 GenBank 中 SPCSV 西非(WA)株系 CP 基因和 sweepoviruses 基因组核苷酸序列的保守区域设计引物 SPCSV-CP-F (5'-GAACCTTGACTCT-GACTCCGAT-3')/SPCSV-CP-R (5'-AGAGCGTTC-CTTTTCATCATCA-3'), 扩增片段大小为 674 bp; SP-F (5'-CGGAGGCTGAACTTCGAGACA-3')/SP-R (5'-GAACGTCCATCTTGAATCATAG-3'), 扩增片段大小为 180 bp。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

按照植物总 RNA 提取试剂盒和植物 DNA 提取试剂盒说明书分别提取薯块 RNA 和 DNA。10 μL 反转录体系: 10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL、5× Prime Script Buffer 2 μL、200 U/μL 反转录酶 0.5 μL、40 U/μL RNase 抑制剂 0.25 μL、10 μmol/μL 上下游引物各 0.5 μL、200 ng/μL 总 RNA 5.75 μL; RT 反应程序: 42℃ 反转录 40 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。

常规 PCR 反应体系: 20 μL SPCSV 的 PCR 反应体系: Premix Ex Taq™ 10 μL、10 μmol/μL 上下游引物各 0.5 μL、cDNA 2 μL、ddH₂O 补足 20 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。20 μL sweepoviruses 的 PCR 反应体系: Premix Ex Taq™ 10 μL、10 μmol/μL 上下游引物各 1 μL、200 ng/μL 甘薯薯块总 DNA 模板 1 μL、ddH₂O 补足 20 μL。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 延

伸 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

多重 PCR 体系的筛选: 在其它条件不变情况下, 筛选一个条件。引物 SPCSV-CP-F/SPCSV-CP-R 和 SP-F/SP-R 浓度在 0.5~1.2 μL 之间设 0.5 μL /1 μL 、0.5 μL /0.5 μL 、0.8 μL /1.2 μL 、1 μL /1 μL 、0.5 μL /0.8 μL 5 个处理; 退火温度在 48~60℃ 之间设 8 个梯度处理为 48.0、50.4、51.8、54.7、56.2、57.6、58.8、60.0℃; 模板浓度在 0.5~1 μL 之间共设 6 个处理, cDNA/DNA 浓度分别为 0.5 μL /1 μL 、0.8 μL /1.2 μL 、1 μL /1 μL 、0.5 μL /0.5 μL 、1 μL /0.5 μL 、0.5 μL /0.8 μL 。

灵敏性试验: 分别利用 SPCSV 和 sweepovirus 病毒的重组质粒测定其浓度, 根据阿伏伽德罗常数计算出质粒的拷贝数。对重组质粒进行 10 倍梯度稀释 10^{-1} ~ 10^{-10} , 然后进行多重 PCR 扩增。特异性试验: 提取含 SPFMV 薯块的 RNA 和 DNA, 反转录后进行 PCR 扩增。

田间样品的检测: 选择采自田间的甘薯薯块, 提取薯块的 DNA 和 RNA, 分别利用建立的多重 PCR 反应体系和常规 PCR 方法对样品进行扩增, 比较多重 PCR 和常规 PCR 方法的扩增效果。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 检测体系的建立

综合考虑扩增效果和试验成本, 最终优化的多重 PCR 反应体系为 20 μL , ExTaq Mix 预混酶 10 μL , SPCSV-CP-F 和 SPCSV-CP-R 均为 0.5 μL , SP-F 和 SP-R 均为 1 μL , cDNA 和 DNA 分别为 0.5 μL 和 1 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。利用所建的多重 PCR 方法对同时感染 SPCSV 和 sweepoviruses 的薯块样品进行检测, 结果表明, 多重 PCR 的扩增结果与常规 PCR 的扩增结果一致(图 1)。

2.2 多重 PCR 检测体系的灵敏度和特异性

灵敏度检测试验结果表明, 建立的多重 PCR 方法对 SPCSV 和 sweepoviruses 的最低检测浓度分别为 1.96×10^5 拷贝/ μL 和 3.57×10^5 拷贝/ μL , 说明该方法可实现对 2 类甘薯病毒 10^5 拷贝水平的检测。特异性检测结果表明, 建立的多重 PCR 方法均能在含 SPCSV 和 sweepoviruses 的薯块样品中扩增出目的条带, 而在含 SPFMV 的薯块中未扩增出任何条带, 说明该方法有较好的特异性。

2.3 田间样品的检测

分别利用建立的多重 PCR 和常规 PCR 方法对采自田间的 16 份甘薯薯块样品进行检测, 结果表明, 其中 10 份样品为 SPCSV 和 sweepoviruses 阳性,

2 份样品为 SPCSV 阳性, 1 份为 sweepoviruses 阳性。多重 PCR 检测结果与常规 PCR 检测结果一致。

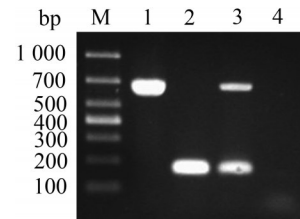


图 1 感染 SPCSV 和 sweepoviruses 的薯块样品多重 PCR 和常规 PCR 扩增结果比较

Fig. 1 Comparison between multiplex and conventional PCR methods for detection of sweepoviruses and SPCSV in sweet potato

1: 常规 PCR 扩增 SPCSV; 2: 常规 PCR 扩增 sweepoviruses; 3: 多重 PCR; 4: 阴性对照。1: Detection of SPCSV by using conventional PCR; 2: detection of sweepoviruses by using conventional PCR; 3: multiplex PCR; 4: negative control.

3 讨论

有关多重 PCR 检测甘薯薯块病毒的研究较少, 张盼等(2013)利用 RT-PCR 方法能从甘薯叶片和薯块中检测到 2 种 RNA 病毒, 而本研究建立了在 1 次 PCR 反应中同时检测甘薯薯块中 RNA 和 DNA 两类病毒的方法, 即可同时检测是否存在 SPCSV 和 sweepoviruses, 该方法可用于田间样品的检测, 也可用于甘薯种薯的质量监控。种植脱毒甘薯是防治病毒病最经济有效的方法, 2017 年颁布实施的国家农业行业标准(NY/T 402—2016)已将 SPCSV 和 sweepoviruses 列为脱毒甘薯的检测对象, 多重 PCR 检测方法的建立, 也为脱毒甘薯种薯种苗的病毒检测提供了技术手段, 将有助于脱毒甘薯的培育和大面积推广应用。

参考文献 (References)

- Fauquet CM, Stanley J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology*, 142(2): 165–189
- Kreuze JF, Savenkov EI, Valkonen JPT. 2002. Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of *Sweet potato chlorotic stunt virus* reveal several new features for the genus *Crinivirus*. *Journal of Virology*, 76(18): 9260–9270
- Zhang P, Lan XZ, Qiao Q, Zhang DS, Qin YH, Tian YT, Wang S, Zhang ZC. 2013. Development and application of a multiplex RT-PCR detection method for sweet potato virus disease (SPVD). *Plant Protection*, 39(2): 86–90 (in Chinese) [张盼, 兰新芝, 乔奇, 张德胜, 秦艳红, 田雨婷, 王爽, 张振臣. 2013. 甘薯病毒病害 (SPVD) 的多重 RT-PCR 检测方法及其应用. *植物保护*, 39(2): 86–90]

(责任编辑: 王璇)