

我国马铃薯帚顶病毒的分子检测

Molecular detection of potato mop-top virus in China

杨 雯 何成勇 姜继红 张志想 李世访*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

Yang Wen He Chengyong Jiang Jihong Zhang Zhixiang Li Shifang*

(State Key Laboratory for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

马铃薯是我国第四大粮食作物,在生长过程中易受多种病毒侵染,其中马铃薯帚顶病毒(potato mop-top virus, PMTV)致病性强、危害严重,被我国列入进境植物检疫禁止进境物名录。该病毒于1966年在爱尔兰和北苏格兰被首次发现(Calvert & Harris, 1966),随后扩散蔓延到世界诸多马铃薯主产区。感染该病毒的植株主要表现为帚顶,上部叶片出现褪绿V型环纹,基部叶片出现不规则黄色斑块、环纹和线状纹;块茎内部切开呈坏死弧纹或条纹。该病毒主要通过块茎、粉痂菌传播(雷艳等,2014),严重影响马铃薯的产量和品质。张仲凯等(2003)首次在我国云南省通过电镜观察发现疑似PMTV,但缺乏血清学与分子生物学鉴定,目前PMTV在我国的发生分布情况尚不清楚。因此,本研究对自全国11个马铃薯产区采集的242份样品进行RT-PCR检测,明确PMTV在我国的发生情况,以期能及时防治马铃薯帚顶病毒病提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试马铃薯:2018—2019年从北京(9份)、广东(12份)、四川(6份)、山东(39份)、甘肃(61份)、青海(27份)、重庆(23份)、山西(18份)、陕西(11份)、贵州(10份)及内蒙古(26份)共11个省(自治区、市)的马铃薯产区共采集样品242份,其中41份为试管苗,201份为马铃薯块茎。品种主要包括粤引85-38、荷兰十五、刘氏新一号、青薯9号、希森3号、费乌瑞它、陇薯10号、夏波蒂库、晋薯16号、冀薯8号、紫花白二代等。试管苗样品取叶片、块茎样品取表皮进行RT-PCR检测。

供试阳性样品:阳性样品为含PMTV的cDNA,

由黑龙江省农业科学院苗木脱毒研究所提供,经RT-PCR鉴定确认。

试剂和仪器:RNAprep Pure多糖多酚总RNA提取试剂盒、 $2\times Taq$ PCR Mastermix,天根生化科技(北京)有限公司;M-MLV反转录酶、DNA凝胶回收试剂盒,美国Axygen公司;其余试剂均为国产或进口分析纯。My Cycle PCR仪,美国Bio-Rad公司;DYY-6C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;KCBIO-2008凝胶成像系统,北京原平皓生物技术有限公司。

1.2 方法

按照RNAprep Pure多糖多酚总RNA提取试剂盒操作说明分别提取242份马铃薯样品的总RNA。反转录体系: $5\times M$ -MLV Buffer 2 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μ L、200 U/ μ L M-MLV 0.5 μ L、40 U/ μ L RNase Inhibitor 0.5 μ L、10 μ mol/L Oligo(dT)0.5 μ L、10 μ mol/L 6-mer随机引物0.5 μ L、总RNA 1 μ L、DEPC H₂O补足至10 μ L。混匀后于42℃反应1 h,产物直接用于PCR反应或于-20℃保存。利用RT-PCR技术检测供试马铃薯样品是否含PMTV,以含PMTV的cDNA作为阳性对照,以ddH₂O作为阴性对照。检测区段为PMTV的RNA3上特异性CP序列,引物C819(5'-CTATGCACCAGCCCAGCGTAACC-3')/H360(5'-CATGAAGGCTGCCGTGAGGAA-3')由北京六合华大基因科技有限公司合成。20 μ L反应体系: $2\times Taq$ PCR Master Mix 10 μ L、cDNA 2 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L,ddH₂O补足至20 μ L。反应程序:94℃预变性1 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。将电泳条带呈阳性的样品切胶、纯化和回收目的片段。回收

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: sfli@ippcaas.cn

收稿日期:2019-06-05

