

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00366

番茄黄化曲叶病毒的快速分子检测

李常保¹, 崔彦玲¹, 张丽英¹, 李传友²

1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

摘要: 番茄黄化曲叶病毒是当前世界范围内危害番茄生产的毁灭性病害。文章针对番茄黄化曲叶病毒全基因组序列的特异区段自主设计了 1 对特异性 PCR 引物(上游引物 TYLCV-F: 5'-ACGCATGCCTCTAATCCAGTGTA-3', 下游引物 TYLCV-R: 5'-CCAATAAGGCGTAAGCGTGTAGAC-3'), 依据 PCR 扩增特异片段 543 bp 的有无可以快速、准确、高效、特异地检测出是否感染了 TYLCV 病毒, 这项技术可以方便地应用到工厂化育苗的带毒性检测、蔬菜大规模生产中植株发病情况的快速检测以及抗病毒育种, 从而为蔬菜安全可持续生产提供科技支撑。

关键词: 番茄黄化曲叶病毒; 特异引物; 分子检测

Molecular detection of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)

LI Chang-Bao¹, CUI Yan-Ling¹, ZHANG Li-Ying¹, LI Chuan-You²

1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is currently considered as one of the most devastating viruses in cultivated tomatoes (*Solanum lycopersicum*) worldwide. We reported here the development of a PCR-based method to quickly detect TYLCV using the primer pairs (TYLCV-F: 5'-ACG CAT GCC TCT AAT CCA GTG TA-3' and TYLCV-R: 5'-CCA ATA AGG CGT AAG CGT GTA GAC-3'), which was designed based on the genome sequence of TYLCV. A TYLCV-specific band of 543 bp was amplified from infected tomato plants. This protocol provides a rapid, reliable, and sensitive tool for molecular detection and identification of TYLCV in the industrial seedling and virus resistance breeding to facilitate safe and sustainable production of tomato.

Keywords: tomato yellow leaf curl virus (TYLCV); specific primer; molecular detection

番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)于 2002 年传入我国南方省份, 近几年TYLCV 自南向北、自东向西的途径在我国多个省市发展蔓

延, 严重威胁着我国的番茄生产^[1~6]。2009 年夏秋季以来, TYLCV在北京郊区县陆续发生, 且病情发展迅速呈蔓延趋势^[7]。针对TYLCV病毒病的发生和危

收稿日期: 2011-10-05; 修回日期: 2011-11-04

基金项目: 国家公益性行业科研专项(编号: 201003065), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2009AA10Z104), 北京市优秀人才项目、北京主要作物高效育种关键技术合作研发项目和蔬菜高效育种技术研发与重大品种选育项目(编号: D11110000131102)(编号: 2010DFB33740)资助

作者简介: 李常保, 博士, 研究员, 研究方向: 番茄遗传育种及分子生物学。Tel: 010-51503486; E-mail: lichangbao@nerv.org

致谢: 感谢浙江大学周雪平教授惠赠 TYLCV 侵染性克隆。

网络出版时间: 2011-11-30 10:35:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111130.1035.006.html>

害,如何准确、快速、高效地诊断该病毒的存在和发生,是蔬菜安全可持续生产的迫切需要。当前报道的对于 TYLCV 相关分子检测,基本上都是采用兼并引物进行的检测,而针对 TYLCV 本身序列进行的快速高效的分子检测未见报道。本文基于 TYLCV 全序列的特异区段设计特异引物,通过PCR技术,根据特异片段的有无从而准确、快速、高效、特异性地检测植株是否感染了该病毒。本研究旨在建立一项 TYLCV 的分子检测技术,可以方便地应用到工厂化育苗的带毒性检测、蔬菜大规模生产中植株发病情况的快速检测以及抗病毒育种,从而为 TYLCV 的综合防控以及蔬菜安全可持续生产提供科技支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

番茄常规栽培品种M82(*S. lycopersicum* M-82, 记为M82)和常规品种CM(*S. lycopersicum* Castlemart, 记为CM)来自美国番茄遗传资源中心(The C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center),种质编号分别为LA3475 和LA2400。其他所检测番茄、茄子、辣椒等均来自北京市农林科学院蔬菜研究中心实验田以及北京和福建等送检单位。DNA提取试剂盒(Plant Genomic DNA Extraction Kit)和PCR 反应体系试剂,包括PCR Buffer、MgCl₂、dNTP、*Taq* DNA Polymerase等购自北京康润诚业生物科技有限公司。引物合成及片段测序由上海生工生物工程技术服务有限公司北京测序部完成。

1.2 方法

1.2.1 植物基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

取植物的叶片,按照DNA提取试剂盒上的方法提取其基因组DNA,利用设计的引物对TYLCV-F/R进行PCR扩增。PCR 扩增采用20 μL体系,其中DNA模板2 μL,10×PCR buffer 2 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μL, dNTP(10 mmol/L) 2 μL, 5 μmol/L 浓度上下游引物每对各取2 μL 混合于一管,*Taq* 酶(5 U/μL)0.3 μL,加水补充至20 μL。PCR扩增条件:94 预变性3 min, 94 变性30 s, 56 复性30 s, 72 延伸30 s, 共30个循环; 72 延伸10 min。PCR产

物进行1%琼脂糖凝胶电泳(含EB),凝胶自动成像仪上检测拍照。

1.2.2 特异引物对的设计

笔者参照比对国际上公布的病毒全序列,基于TYLCV全序列^[8](基因编号:AJ489258.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/21388557>)的特异区段核酸序列自主设计1对PCR引物,上游引物命名为TYLCV-F:5'-ACGCATGCCTCTAATCCAGTGTA-3';下游引物命名为TYLCV-R:5'-CCAATAAGGCGTAAGCGTGTAGAC-3',扩增的目的片段长度为543 bp。该引物对只是针对TYLCV的特异区结合,通过PCR反应可扩增出543 bp目的片段,而对于其他的模板DNA则不能扩增出相应的片段。由此,可以根据特异543 bp片段(命名为TYLCVSF543)的有无作为判断是否感染TYLCV的标准。

1.2.3 TYLCV 侵染性克隆接种

采用人工注射接种TYLCV侵染性克隆^[9],分别接种M82和CM,每处理接种20株,作为试验组;设置不接种病毒的作为对照组。20 d后观察表型,分别计算其发病率。TYLCV侵染性克隆由浙江大学周雪平教授惠赠。

2 结果与分析

2.1 特异引物对有效性的验证

2.1.1 检测不同病毒

在北京市农林科学院蔬菜研究中心番茄大棚里分别采集具有番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)、番茄花叶病毒(ToMV)、番茄蕨叶病毒(CMV)和番茄丛矮病毒(ToBSV)典型症状的番茄病叶,提取其基因组DNA,用自主设计的引物对TYLCV-F/R进行PCR扩增(图1)。

结果表明,该引物对扩增番茄黄化曲叶病毒得到了1条特异性条带(TYLCVSF543),并且片段大小在电泳图中和预期的相对一致;而另外3种病毒症状的样本均没有扩增出该条带,从而证明了该引物对番茄黄化曲叶病毒具有特异性和高效性。

回收特异性条带TYLCVSF543,由上海生工生物工程技术服务有限公司北京测序部进行测序。结果表明,该特异性条带的序列与预期完全一致,长

度为 543 bp。对其序列分析, 自 5'端第 1~72 位核苷酸编码 V1 蛋白、第 69~473 位核苷酸编码 C3 蛋白、第 214~543 位核苷酸编码 C2 蛋白。相关引物信息以及特异片段信息登录在 NCBI 网站, GenBank 登录号为 GU084381(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/262093025>)。

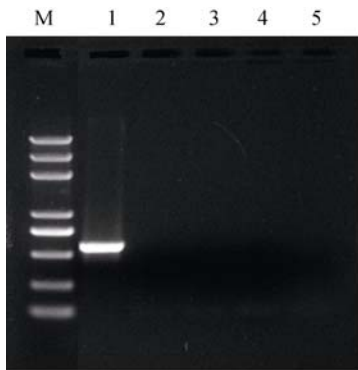


图 1 TYLCV-F/R 引物对特异性地识别 TYLCV 病毒
M: DL2000 plus; 1: TYLCV; 2: ToMV; 3: CMV; 4: ToBSV; 5: 空白对照。

2.1.2 通过接种鉴定检测 TYLCV

利用人工注射接种技术, 对番茄常规栽培品种 M82 和 CM 接种 TYLCV 侵染性克隆, 以不接种的材料作对照, 20 d 后观察表型, 分别计算其发病率(图 2)。

试验组 M82 和 CM 表现典型的病症, 发病率均为 100%, 而对照组生长正常。利用 CTAB 法^[10]分别提取试验组和对照组的基因组 DNA, 用 TYLCV-F/R 进行 PCR 扩增, TYLCV 病毒的基因组 DNA 作为扩增阳性对照, 不加入模板 DNA 作为空白对照。结果如图 3 所示, 对照组 M82 和 CM, 因其并未感染 TYLCV, 其扩增结果都未显示特异条带 TYLCVSF543; 试验组 M82 和 CM, 均显示特异条带 TYLCVSF543; 阳性对照显示特异性条带 TYLCVSF543; 空白对照无特异性条带 TYLCVSF543。由此表明, 利用 TYLCV-F/R 引物对, 根据 PCR 扩增后 TYLCVSF543 片段的有无可以方便快捷地检测到番茄植株中是否感染了 TYLCV 病毒。

2.2 特异引物对检测 TYLCV 在番茄作物上的应用

所提供的基于番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)特异

区段核酸序列的引物对 TYLCV-F/R, 具有特异性好、灵敏度高的优点, 可以从分子水平准确、快速、高效地检测植株中的 TYLCV。

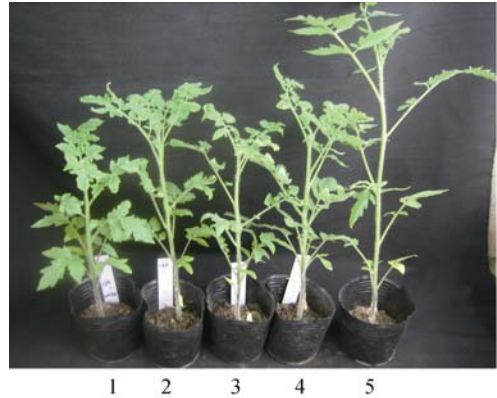


图 2 番茄 TYLCV 接种性状表现
1~4: 接种植株; 5: 未接种对照。

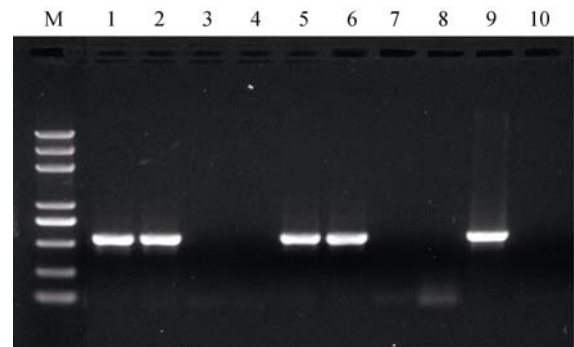


图 3 番茄病毒接种检测结果
M: DL2000 plus; 1-2: 接种 TYLCV 的 CM; 3-4: 未接种 TYLCV 的 CM; 5-6: 接种 TYLCV 的 M82; 7-8: 未接种 TYLCV 的 M82; 9: TYLCV 对照; 10: 空白对照。

2.2.1 北京郊区县 TYLCV 发生情况检测

对北京郊区县番茄生产 TYLCV 发病情况进行调查检测, 337 份番茄检测样本中, 163 份带有 TYLCV 病毒, 占总样本数的 48%; 174 份未检测出 TYLCV。部分感染 TYLCV 病毒样本的电泳结果如图 4 所示。

这次普查和检测的结果表明, 目前京郊种植的番茄主栽品种尚没有对 TYLCV 抗病的品种, 而大多数主栽的粉色大果番茄品种对该病毒敏感, 发病严重; 发病遍及通州、大兴、顺义、平谷、密云、延庆、昌平、房山、丰台、朝阳、海淀等区县 60 多

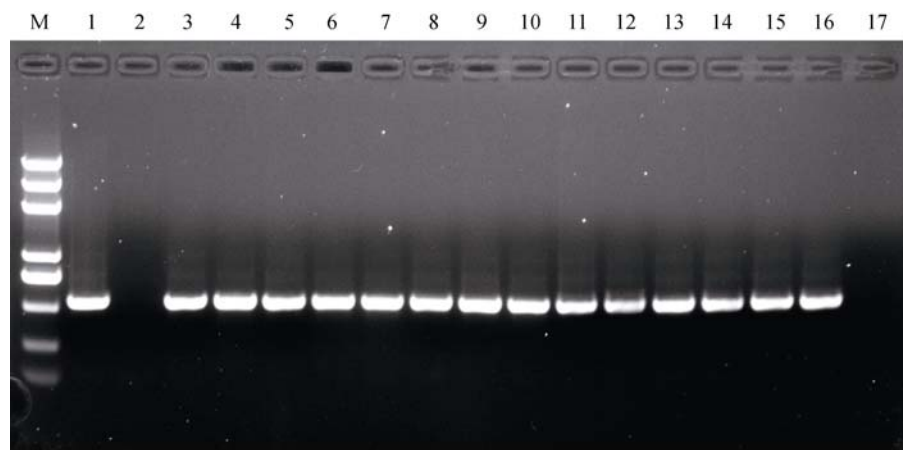


图4 北京郊区县 TYLCV 分子检测

M: DL2000 plus; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~16: 检测样本; 17: 空白对照。

个乡镇。由此可见, 番茄黄化曲叶病毒已经在京郊番茄主产区以及主栽品种上普遍发生, 并且具有蔓延加重的趋势, 必须引起高度重视。

2.2.2 福建省莆田市 TYLCV 检测

对种植在福建省莆田市荔城区黄石镇珠坑村的 2 hm²番茄品种美的(MAIND)(英文标示为YARDEN 827)和金山村的 0.46 hm²番茄品种美的(MAIND)(英文标示为TORCH)的TYLCV发生情况分别进行现场调查。两地的番茄田间植株上部叶片均出现典型的TYLCV症状, 发病率分别为 100 %和 61 %。

分别对两品种发病样本抽样, 发病样本两次生物学重复, 部分感染 TYLCV 病毒样本的电泳结果如图 5 所示, 结果表明, 发病样本检测到 TYLCV 病毒(显示 TYLCVSF543 条带), 所设对照样本中未检测到 TYLCV 病毒(未显示 TYLCVSF543 条带)。

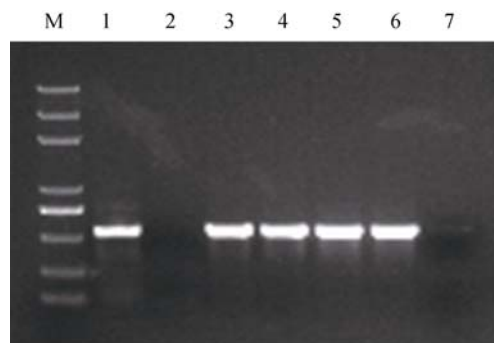


图5 福建省莆田市 TYLCV 检测

M: DL2000 plus; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3, 4: YARDEN827; 5, 6: TORCH; 7: 空白对照。

2.2.3 工厂化育苗带毒性检测

随着设施蔬菜生产的发展, 蔬菜育苗工厂化、集约化程度越来越高, 规模越来越大。这在提高生产效率的同时, 也附带一定的风险, 那就是要求所培育的是无毒苗才能投放于生产, 否则将给蔬菜生产带来毁灭性的灾难。特别是针对目前 TYLCV 爆发蔓延的形势, 工厂化育苗在出厂前进行 TYLCV 带毒性抽检具有必要性和紧迫性。

应北京市延庆县综合试验站的请求, 对于他们一批 10 万株的番茄幼苗进行抽检检测 TYLCV, 采用随机取样法, 选取 15 个取样点, 每个取样点随机抽取 10 株番茄幼苗, 每株幼苗剪取 1/3 叶片, 每取样点的 10 株番茄所取叶片进行混合提取 DNA, 形成了 15 个混合样本进行分子检测, 结果表明这批幼苗未检测出 TYLCV, 为无毒苗, 可以用于番茄生产。

总之, 利用特异引物 TYLCV-F/R, 通过 PCR 扩增技术对北京郊区县番茄生产 TYLCV 发病情况、北京市延庆县番茄工厂化育苗以及福建省莆田市的番茄 TYLCV 进行调查检测。结果表明, 检测出病毒的样本(显示 TYLCVSF543 条带)均具有 TYLCV 典型症状; 未检测出病毒的样本(未显示 TYLCVSF543 条带)不具有 TYLCV 症状, 进一步证实了 TYLCV-F/R 引物对检测番茄是否感染 TYLCV 病毒的结果真实有效。

2.3 特异引物对检测 TYLCV 在其他作物上的应用

TYLCV 病毒可以侵染茄科、豆科等多种植物,

主要危害番茄、辣椒、茄子、甘蓝和黄瓜等蔬菜以及烟草等经济作物。对于感染 TYLCV 病毒的番茄、辣椒、茄子、烟草植株,利用该特异引物进行了检测,结果如图 6 所示,从分子水平能够方便快捷地检测到这些植株感染了 TYLCV。

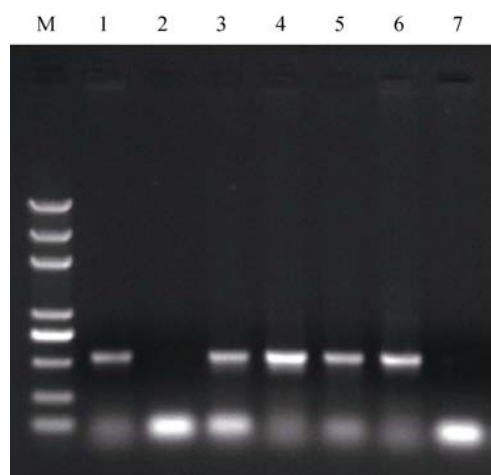


图 6 TYLCV 分子检测技术在其他作物上的应用

M: DL2000 plus; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 番茄; 4: 辣椒; 5: 茄子; 6: 烟草; 7: 空白对照。

3 讨论

在植物基因组DNA快速制备技术方面,王伟伟等^[11]报道了一种简便快速制备叶片基因组DNA的方法。制备过程只需一种提取试剂、只涉及 1 次移液和 1 次离心操作,该项DNA 快速制备及相适应的实时荧光定量PCR 技术已成功应用于番茄转基因植株检测。若结合目前德国Retsch M400 型组织研磨仪或者其他公司推出的各类研磨仪,在DNA高通量提取操作上将省时省力,更加方便快捷。

利用笔者所自主设计的特异引物,可以通过PCR 技术方便快捷、准确高效地检测到番茄、辣椒、茄子、烟草等作物所感染 TYLCV 情况。这项技术可以方便地应用到工厂化育苗的带毒性检测、蔬菜大规模生产中植株发病情况的快速检测、抗病毒育种材料的鉴定筛选以及抗病毒新品种的培育,从而为 TYLCV 的综合防控及蔬菜安全可持续生产提

供科技支撑。

参考文献(References):

- [1] 蔡健和, 秦碧霞, 朱桂宁, 黄福新, 陈永惠, 李焜华. 番茄黄化曲叶病毒病在广西爆发的原因和防治策略. 中国蔬菜, 2006, (7): 47–48. DOI
- [2] 何自福, 虞皓, 毛明杰, 罗方芳, 林奕韩, 王穗涛. 中国台湾番茄曲叶病毒侵染引起广东番茄黄化曲叶病. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 119–123. DOI
- [3] 赵统敏, 余文贵, 周益军, 季英华. 江苏省番茄黄化曲叶病毒病(TYLCD)的发生与诊断初报. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 654–655. DOI
- [4] 吴永汉, 张纯霄, 许方程, 李芳芳, 陈为康, 卢启强, 夏万青. 温州地区番茄曲叶病毒病发生与防治. 中国蔬菜, 2007, (5): 57–58. DOI
- [5] 于力, 朱龙英, 万延慧, 杨少军, 张辉, 朱为民. 上海地区番茄黄化曲叶病毒病的鉴定及嫁接接种法研究. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 115–118. DOI
- [6] Zhang H, Gong HR, Zhou XP. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China. *Virus Gen*, 2009, 39(2): 249–255. DOI
- [7] 李常保, 柴敏, 李季, 郑建秋. 北京番茄黄化曲叶病毒病的发生及分子检测. 中国蔬菜, 2010, (1): 28–30. DOI
- [8] Morilla G, Janssen D, García-Andrés S, Moriones E, Cuadrado IM, Bejarano ER. Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology*, 2005, 95(9): 1089–1097. DOI
- [9] 叶剑, 青玲, 周雪平. 与中国番茄黄化曲叶病毒伴随的DNA β 分子 β C1 缺失突变体介导的交叉保护作用初步研究. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2006, 32(5): 479–482. DOI
- [10] Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*, 1989, 7(5): 514–520. DOI
- [11] 王伟伟, 朱长青, 刘小花, 陈昆松, 徐昌杰. 番茄叶片基因组DNA快速制备技术及其在基于实时荧光定量PCR的转基因检测中的应用. 遗传, 2011, 33(9): 1017–1022. DOI