

应用 RT-PCR 检测番茄上的 CMV 和 ToMV

何自福¹, 虞 皓¹, 余雪松², 罗方芳¹

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要:建立了广东番茄花叶病主要病原 CMV 和 ToMV 的 RT-PCR 检测技术. 应用该技术对采集于广东番茄主要产区的病样本进行检测, 结果表明: 10 个采样地点中均检测到 CMV, 仅 2 个点检测到 ToMV; 在所采集的 49 个病样本中, CMV 和 ToMV 所占的比例分别为 79.6% 和 12.2%, 说明广东番茄花叶病毒原主要是 CMV, 其次是 ToMV.

关键词: RT-PCR; 番茄花叶病; 检测

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0036-04

番茄花叶病是国内外番茄生产上的主要病害之一, 该病害在广东番茄产区普遍发生. 据文献报道, 在我国引起该病害的病原主要有 TMV、CMV、PVX 和 PVY 等^[1,2], 而广东主要是 CMV 和 TMV^[3]. 在“六五”和“八五”期间, 通过参加番茄病毒病的鉴定和抗病育种全国协作攻关, 我省蔬菜育种专家与植物病理专家合作, 先后选育出粤红玉(抗 CMV)和粤星(抗 ToMV、中抗 CMV)等杂交番茄新品种, 在生产上大面积推广种植, 取得了较好的社会效益^[4]. 然而近年来, 该病在我省为害明显上升, 并有逐年加重趋势. 因此, 有必要对我省番茄花叶病的病毒主要种类及其株系开展进一步研究.

由于 ToMV 与 TMV 的亲缘关系十分相近, 以致一段时间, 国内研究者曾将其作为 TMV 来研究^[1~3,5]. 但事实上, 二者在生物学、血清学及核苷酸序列上都存在明显的差异^[6,7]. 另据文献报道, 由于 TMV 复制和传播的速度较 ToMV 慢, 所以 TMV 很少在番茄上发生^[8].

传统检测 CMV 和 ToMV 的方法为指示植物法和 ELISA 法. 指示植物法检测速度慢, 且受季节限制, 多数情况下还需要结合电镜观察病原形态和血清学试验才能作出判定; ELISA 法的灵敏度不够高, 且易出现非特异性反应. PCR 技术是一种灵敏度高、特异性强、速度快的检测方法. 因此, 本试验试图建立一种灵敏可靠、快速实用的番茄花叶病主要病原 RT-PCR 检测方法, 以便长期监测广东省番茄花叶病病原流行动态及其分布, 进而指导番茄抗病毒育种.

1 材料与方法

1.1 引物的设计

根据 GenBank 中 CMV-K 株系基因组序列(access-

sion No. S72187)和 ToMV 中国分离物基因组序列(accession No. AJ132845), 分别设计 1 对引物用于扩增 2 个病毒复制酶基因片段, 各引物在原序列中的位置见各引物序列后括号内; 同时为了便于克隆和序列分析, 在各引物的 5' 端分别加上酶切位点(下划线). 2 对引物序列分别为:

CMV: 5' 端引物为 5'-GGCA GATTCTGAACGGTAGT-TACGGTGTG-3' (位于 119 bp ~ 138 bp)

3' 端引物为 5'-GAAT GGATCCAACGTCGTGCG-CCTCACA-3' (位于 563 bp ~ 582 bp)

ToMV: 5' 端引物为 5'-GGCT GGATCCTAATACCTTG-GTCAACGATC-3' (位于 128 bp ~ 147 bp)

3' 端引物为 5'-GGCT AAGCTTGCATTAT-GTCGCGGACATCC-3' (位于 461 bp ~ 480 bp)

引物由上海生工生物技术工程服务有限公司合成.

1.2 样本总 RNA 的提取

采用 SDS-酚-氯仿法^[9]分别提取 CMV、ToMV 或 TMV(均由广东省农业科学院植物保护研究所蔬菜病虫研究室分离及保存)单独侵染的番茄病标样的总 RNA, 作为反转录模板.

1.3 cDNA 的合成及 PCR

分别取上述 RNA 2 μ L(约 5 μ g)为模板, 依次加入 10 μ mol/L CMV 或 ToMV 的 3' 端特异引物 2 μ L, 5 $\times$ 反应缓冲液 2 μ L, 10 mmol/L 4 dNTPs 1 μ L, RNasin 5 U, AMV 反转录酶 5 U(TaKaRa 公司), 加无 RNase 的双蒸水至 10 μ L; 室温下放置 10 min, 然后 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min. 反应结束后将反转录产物置于冰上.

取反转录产物 2 μ L 作为 PCR 模板, 依次加入 10

×反应缓冲液 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、10 mmol/L 4 dNTPs 0.5 μL、相应的 3' 端和 5' 端特异引物(5 μmol/L)各 2.5 μL、Taq 酶(广州华美公司)1 U, 加双蒸水至 25 μL. 94℃预变性 4 min, 94℃变性 1 min、58℃退火 45 s、72℃延伸 45 s, 30 个循环, 72℃最终延伸 10 min. 反应结束后, 取 10 μL PCR 产物在 0.015 g/mL 琼脂糖凝胶上电泳.

1.4 RT-PCR 灵敏度试验

取标样病叶各 150 mg, 按上述方法提取病样本总 RNA, 用 50 μL 无 RNase 的双蒸水溶解 RNA 沉淀. 然后对其溶液进行 10 倍系列稀释, 作为反转录模板, 合成 cDNA 第一链. 分别取反转录产物 2 μL 作为模板进行 PCR, 以测定 RT-PCR 检测 CMV 和 ToMV 这 2 种病毒的灵敏度.

1.5 病样本的检测

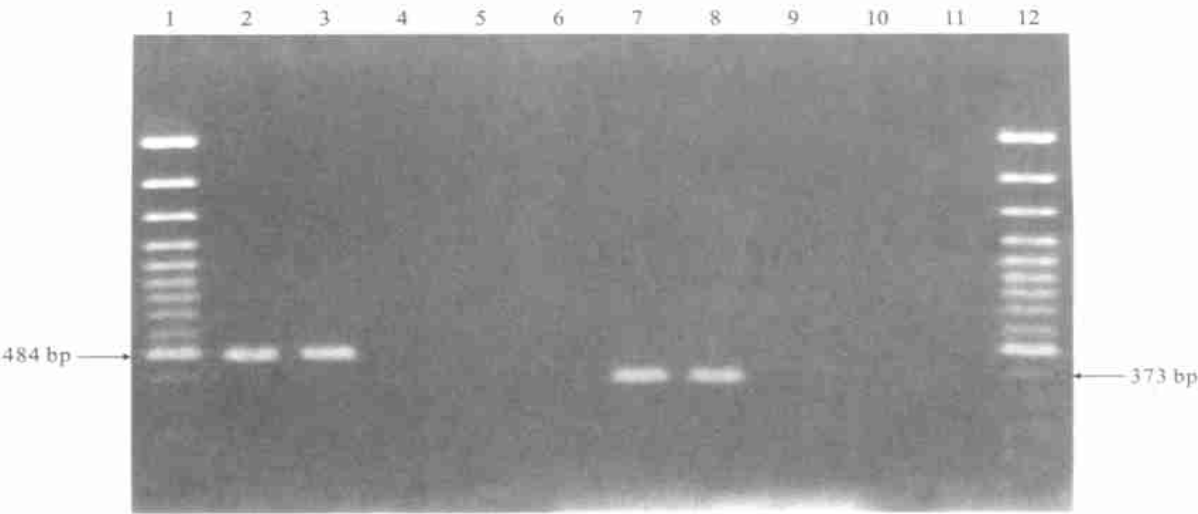
在广东番茄主要产区分别采集有病毒症状或类似病毒症状的病样本, 共计 49 个(表 1), 分别提取各病样本的总 RNA. 按上述建立的方法, 对每个

样本分别用 CMV 和 ToMV 3' 端特异引物进行 cDNA 第一链合成, 再用相应的 3' 端和 5' 端特异引物进行 PCR, 电泳检查结果.

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测方法的建立

分别以 CMV、ToMV 或 TMV 单独侵染的番茄病标样的总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 结果表明(图 1):CMV 侵染的标样用 CMV 特异引物能扩增出 1 条 484 bp 带, 而用 ToMV 特异引物未扩增出任何带; ToMV 侵染的标样用 ToMV 特异引物能扩增出 1 条 373 bp 带, 而用 CMV 特异引物未扩增出任何带; TMV 侵染的标样用 CMV 或 ToMV 特异引物均不能扩增出任何带, 这些与预期的结果一致. 同时, 对扩增的目的片段克隆及序列分析结果表明: 两目的片段与设计引物的原序列的同源分别为 95.3%和 100%, 进一步说明用 2 对特异引物扩增的就是各自病毒复制基因片段. 因此, 可以用这 2 对特异引物通过建立的



1, 12: 100 bp 标准相对分子质量(MBI), 100 bp ladder marker; 2, 3: CMV 标样, samples infected by CMV; 4, 5: TMV 标样, samples infected by TMV; 6: CK₁⁻, healthy control with a pair of CMV special primer; 7, 8: ToMV 标样, samples infected by ToMV; 9, 10: TMV 标样, samples infected by TMV; 11: CK₂⁻, healthy control with a pair of ToMV special primer.

图 1 3 种病毒侵染的番茄病标样 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 The electrophoresis of the sample infected by CMV, ToMV or TMV detected with RT-PCR

RT-PCR 法来分别检测侵染番茄上 CMV 和 ToMV.

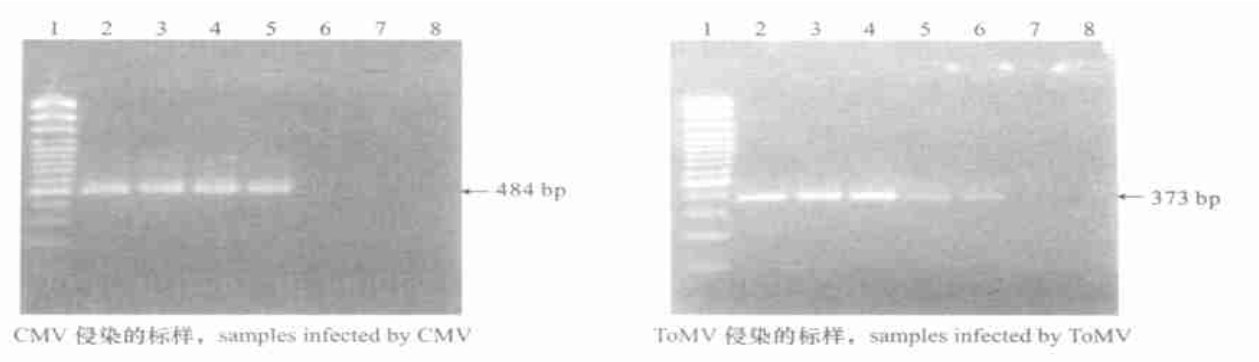
2.2 RT-PCR 检测灵敏度

将从 150 mg 病叶中提取的总 RNA 进行 10 倍系列稀释, 再进行反转录合成 cDNA 第一链及 PCR, 结果(图 2)表明: CMV 和 ToMV 侵染的病标样的总 RNA 分别稀释 10³ 和 10⁴ 时, RT-PCR 仍可获得阳性结果,

分别相当于可检测到 6.0 和 0.6 μg 病叶中的 CMV 和 ToMV.

2.3 番茄花叶病样 RT-PCR 检测结果

用上述建立的 CMV 或 ToMV 侵染的番茄病样本 RT-PCR 检测技术, 对采集于广东番茄主要产区的 49 个病样本进行检测, 结果表明(图 3、表 1): 有 39 个病



1. 100 bp 标准相对分子质量(MBI), 100 bp ladder marker; 2~7. 病标样的稀释度 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 , diseased samples diluted 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 respectively; 8. CK⁻, healthy control.

图 2 RT-PCR 检测 2 种病毒的灵敏度

Fig. 2 The sensitivity of RT-PCR detecting the samples infected by CMV or ToMV



1, 16. 100 bp 标准相对分子质量(MBI), 100 bp ladder marker; 2~7. CMV 特异引物检测病样本 T30~T35, samples T30~T35 detected with a pair of CMV special primer; 8. CK⁻, healthy control with CMV special primer; 9~14. ToMV 特异引物检测病样本 T30~T35, samples T30~T35 detected with a pair of ToMV special primer; 15. CK⁻, healthy control with ToMV special primers

图 3 部分番茄病毒病样 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 The electrophoresis of the part of diseased samples detected with RT-PCR

样本用 CMV 特异引物能扩增出 1 条 484 bp 带, 而用 ToMV 特异引物不能扩增出任何带, 说明其是由 CMV 侵染引起; 有 6 个病样本用 ToMV 特异引物能扩增出 1 条 373 bp 带, 而用 CMV 特异引物不能扩增出任何带, 说明其是由 ToMV 侵染引起; 另外有 4 个病样本用 2 对引物均未扩增出任何条带, 说明其可能是由于其他病毒侵染引起或生理因素产生的。

3 讨论

用 RT-PCR 技术检测广东番茄花叶病主要病原 CMV 和 ToMV 明显优于指示植物法和常规 ELISA 法. 这为快速、准确地大量检测番茄病毒病原提供了技术支持, 对弄清广东番茄花叶病主要病原及分布,

进而指导其番茄抗病毒育种具有十分重要的意义.

根据 RT-PCR 检测的结果, 在 10 个采样地点的样本中均检测到 CMV, 仅在 2 个点的样本中检测到 ToMV; 所采集的 49 个病样本中, CMV 和 ToMV 所占的比例分别为 79.6% 和 12.2%, 说明广东番茄花叶病病原主要是 CMV, 其次是 ToMV. 因此, 广东番茄抗病毒病育种应以抗 CMV 为主攻目标.

本研究的结果同时显示, ToMV 是广东番茄病毒病的主要病原之一, 先前报道的番茄花叶病病原 TMV^[3,5] 中绝大多数很可能就是 ToMV. 关于 TMV、PVX 和 PVY 等在广东省番茄上发生及为害情况的研究正在进行中.

表 1 广东番茄病毒病主要毒原鉴定结果

Tab. 1 Identification of the main causal viruses of tomato virus disease in Guangdong

编号	采集地 localities	样本数	RT-PCR ¹⁾
No.	collecting samples	sample number	
T1—T4	广州市黄埔区	4	CMV
T5—T7	广州市白云区	3	CMV
T8	广州市白云区	1	—
T9—T14	广州市黄埔区笔村	6	CMV
T15—T21	高要市蚬岗镇	7	CMV
T22—T26	三水市金本镇	5	CMV
T27	三水市金本镇	1	—
T28—T32	三水市大塘镇	5	CMV
T33	广州蔬菜研究中心	1	CMV
T34—T36	广州蔬菜研究中心	3	ToMV
T37—T39	增城市石滩镇	3	ToMV
T40—T41	增城市石滩镇	2	CMV
T42—T43	增城市石滩镇白江村	2	—
T44—T45	增城市石滩镇白江村	2	CMV
T46—T49	增城市珠村镇	4	CMV

1) “—”表示该病样用 2 对特异引物进行 RT-PCR 结果均为阴性

参考文献:

[1] 冯兰香, 蔡少华, 郑贵彬, 等. 我国番茄病毒病的主要

毒原种类和番茄上烟草花叶病毒株系的鉴定[J]. 中国农业科学, 1987, 20(3): 60—66.

[2] 冯兰香, 田如燕, 杨翠荣, 等. 中国北方番茄主要病毒种类普查及 TMV、CMV 株系鉴定[J]. 植物保护学报, 1996, 23(1): 52—55.

[3] 范怀忠, 孙芥菲, 高乔婉, 等. 广东番茄花叶病毒的鉴定[J]. 华南农学院学报, 1982, 3(3): 66—72.

[4] 郑锦荣, 黎壁然, 黄爱兴, 等. 番茄抗病品种的选育研究 A]. 冯兰香, 杨又迪. 中国番茄病虫害及其防治技术研究 C]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 18—21.

[5] 郑贵彬, 徐鹤林, 熊助功. 我国为害番茄的病毒种群与烟草花叶病毒(TMV)株系分化的初步研究[J]. 病毒学杂志, 1988, (1): 64—70.

[6] 周雪平, 钱秀红, 刘 勇, 等. 侵染番茄的番茄花叶病毒的研究[J]. 中国病毒学, 1996, 11(3): 268—276.

[7] 周雪平, 薛朝阳, 刘 勇, 等. 番茄花叶病毒番茄分离物与烟草花叶病毒蚕豆分离物生物学、血清学比较及 PCR 特异性检测[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 53—58.

[8] HOLLINGS M, HUTTINGA H. Tomato mosaic virus CMV/AAB[J]. Description of Plant Virus, 1976, 156: 1—6.

[9] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒索 G S, PCR 技术实验指南 [M]. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 等译. 北京: 科学出版社, 1999. 81—82.

Detection of CMV and ToMV on Tomato by RT-PCR

HE Zi-fu¹, YU Hao¹, YU Xue-song², LU Fang-fang¹

(1 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 Laboratory of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:The RT-PCR detection technique of the causal viruses CMV and ToMV of the tomato mosaic disease in Guangdong Province was established. The technique was used to detect the diseased samples collected from main regions-producing tomato in Guangdong province. The result showed that CMV was detected in all of ten localities of sampling, and ToMV detected in two localities, and that among the forty-nine samples CMV and ToMV were 79.6% and 12.2% respectively. It implied that the causal viruses of tomato mosaic disease in Guangdong Province were mainly CMV.

Key words: RT-PCR; tomato mosaic disease; detection

【责任编辑 周志红】