

人参果 PVM 病毒的克隆与鉴定

张菲菲, 张金文, 高宜峰, 姚攀锋

(甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 通过对武威市凉州区人参果感病植株所表现出来的花叶、皱缩、植株矮小等症状观察, 初步判断可能感染了马铃薯 M 病毒 (PVM)。结合分子生物学手段, 提取感病人参果叶片总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增到一段长 300 bp 的基因序列, 连接至 PMD19-T 载体并测序。测序结果同 GeneBank 中 PVM CP 基因序列 [GI:361071296] 同源性达到了 98.97%, 说明成功克隆到了 PVM 基因片段, 即供试人参果确实感染了 PVM 病毒。

关键词: 人参果; PVM 病毒; 克隆; 鉴定

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2013)08-0018-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2013.08.006

Cloning and Identification of The PVM Virus of Ginseng Fruit

ZHANG Fei-fei, ZHANG Jin-wen, GAO Yu-feng, YAO Pan-feng

(College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The mosaic, wrinkled, small plant and other symptoms of susceptible plants of Liangzhou ginseng fruit were observed, the auditor should make a pre-judgment that may be infected with potato virus M (PVM). Experiments combined with molecular biology methods and extract leaves total RNA of the patient feeling of ginseng fruit, it was amplified by RT-PCR method to a long 300 bp gene sequences and connected to PMD19-T vector and sequenced. The Sequencing results showed that homology reached 98.97% with the GeneBank PVM CP gene sequence [GI: 361071296], it can explain gene fragment was cloned into the PVM successful, that the test does ginseng fruit infected with PVM virus.

Key words: Ginseng fruit; PVM virus; Cloning; Identification

人参果 (*Solanum muricatum*) 又称香瓜茄, 茄瓜等, 原产于哥伦比亚和智利安第斯山温带地区, 为茄科半木质化多年生草本植物。20世纪80年代, 我国从新西兰将其引入沿海地区后, 逐步向华北及西北地区扩展^[1]。近年来, 国内节能日光温室栽培人参果的面积迅速扩大, 部分地区已成规模化栽培。甘肃省人参果栽培主要分布在武威市凉州区、天祝县、古浪县, 其中凉州区的张义镇和天祝县的哈溪镇栽培相对集中, 已发展成为河西走廊的重要产业。但欠规范的无性繁殖及连年高温高湿的栽培环境使田间病毒病的发生流行日趋严重, 已影响到人参果产业的发展。据观察, 人参果植株所表现出来的症状和马铃薯M病毒(PVM)侵染植株后的症状极为相似^[2], 主要危害植物的叶片, 影响植株的正常生长, 导致减产或果实品质低劣。

目前, 病毒检测的方法有多种, 主要采用核酸

杂交、PCR技术、血清学检测法、酶标免疫吸附法 (ELISA)、电镜负染检测法及免疫电镜检测等方法进行植物病毒鉴定^[3]。传统的常规生物学鉴定方法稳定可靠, 但检测周期较长, 费时费事。以病毒包被蛋白抗原及其用免疫动物制备的多克隆或单克隆抗体反应为基础的血清学检测法, 也存在血清制备及操作步骤烦琐等不足。我们采用以病毒核酸为对象的PCR技术^[4], 首次对甘肃省河西走廊感病区人参果是否感染了马铃薯M病毒 (PVM) 进行了鉴定, 为人参果病毒检验检疫及抗病性研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

参试人参果品种为长丽、大紫及阿斯卡, 感病植株采自甘肃省武威市凉州区人参果种植区的塑料大棚, PCR引物合成及DNA序列测定由生工生物(上海)有限公司完成。

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 甘肃省科技支撑计划“用融合基因 dsRNA 获得抗病性人参果种质资源的研究”(1011NKCA077)部分内容; 甘肃省农牧厅农业生物技术专项“导入甜蛋白基因创造甜味人参果种质研究”(GNSW-2012-22)部分内容

作者简介: 张菲菲(1984—), 女, 甘肃庆阳人, 在读硕士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 312857931@qq.com

通讯作者: 张金文(1958—), 男, 甘肃武威人, 教授, 博士, 研究方向为生物技术。联系电话: (0931)7631167。E-mail:

jwzhang305@163.com

1.2 方法

1.2.1 植株总RNA的提取及反转录 用天根生化科技(北京)有限公司的总RNA提取试剂盒(目录号: DP419)提取感病人参果叶片总RNA, 用cDNA第一链合成试剂盒(目录号: KR104)将总RNA反转录成cDNA备用。操作步骤除了在反转录时加入Random和oligo(dT)引物各1 μL外, 其它严格按照产品说明进行操作。

1.2.2 引物的设计与合成 采用RT-PCR方法, 从GenBank中获得PVM CP基因[GI: 361071296], 利用BLAST和Clustal功能进行在线保守性分析并设计引物: 上游引物P1序列为5'-AAATATGCGCCCA-GATCCTAC-3', 下游引物P2序列为5'-CTTCTTCA-GCACAGCCAAGACG-3', 送生工生物(上海)有限公司合成。

1.2.3 PVM目的片段的克隆 以P1/P2序列为上/下游引物, 以cDNA为模板, 最佳PCR扩增体系如表1所示。PCR反应条件为: 94 °C预变性3 min, 94 °C 30 s; 退火温度分别为56.6 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸5 min。反应结束后, 用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测并回收特异目的条带。

表1 PVM靶标片段的PCR反应体系

序号	反应组分	用量 (μL)
(1)	ddH ₂ O	37.0
(2)	10 × PCR Buffer(Mg ²⁺ Plus)	5.0
(3)	dNTP Mix(2.5 mmol/L)	4.0
(4)	上/下游引物(10 pmol/μL)	1.0
(5)	cDNA模板	1.0
(6)	TaKaRa Taq(5 U/μL)	1.0
Total		50

1.2.4 目的片段与克隆载体的连接及鉴定 连接反应按pMD19-T-simple_vector试剂盒说明书进行。10 μL的连接反应体系为: ddH₂O 3 μL, 10 × 缓冲液 1 μL, PCR回收产物 4 μL, pGM-T载体 1 μL, T4连接酶液 1 μL。4 °C 过夜连接16 h后, 转化E.coli DH5a感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 用质粒小量提取法提取质粒DNA, 经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 选取滞后质粒进行PCR及Hind III和Kpn I双酶切鉴定, 并做琼脂糖凝胶电泳, 观察拍照记录。

1.2.5 序列测定及生物信息学分析 将PCR与酶切鉴定正确的重组子穿刺管交由天根生化科技有限公司进行测序。采用分子生物学软件DNAMAN及GenBank数据库中的序列对测序结果进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 总RNA的提取结果

通过电泳检查, 提取的人参果植株RNA条带清晰, 亮度高, 完整性好(图1), 适于后续PCR扩

增实验。

2.2 PVM目的片段的克隆结果

以cDNA为模板, P5-1/P3-1为上/下游引物扩增到长度约为300 bp的特异片段(图2), 与预期靶标片段大小一致。

2.3 质粒 Hind III/Kpn I 酶切鉴定

碱裂解法提取重组载体质粒, 经Hind III/Kpn I双酶切, 得到了与目标条带大小相同的条带(图3), 鉴定正确的重组克隆用于测序。

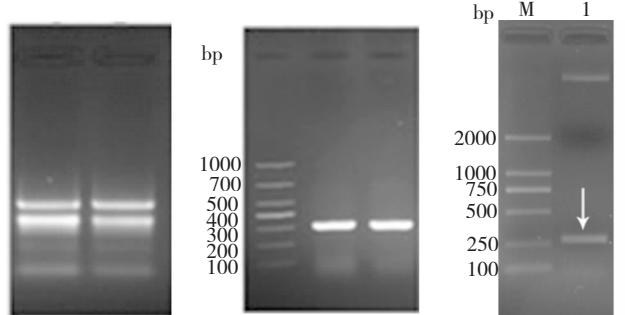


图1 RNA电泳图 图2 靶标片段PVM扩增条带 图3 酶切检测

2.4 PVM靶标片段比对

将PVM CP基因 [GenBank GI: 361071296] 部分序列(上)和来源于人参果病叶的PVM靶标片段测序结果(下)进行比对(图4), 同源性Identity=98.97%, 和实验预期的结果一致, 说明武威凉州区的人参果确实感染了PVM病毒。



图4 PVM CP基因部分序列与人参果PVM靶标片段测序结果对比

3 结论与讨论

1) 通过对人参果田间感病植株所表现出来的花叶、皱缩、植株矮小等症状的观察, 初步判断该地区人参果可能感染了马铃薯M病毒(PVM)。采用分子检测技术^[5-6], 提取感病人参果叶片总RNA, 采用RT-PCR方法扩增到一段长300 bp的PVM病毒

3种植物生长调节剂对葡萄扦插成活率及根系的影响

张致玺¹, 孙忠强¹, 张 琰²

(1. 甘肃省兰州市园艺试验场, 甘肃 兰州 730083; 2. 兰州园艺学校, 甘肃 兰州 730060)

摘要: 试验观察了吲哚丁酸、萘乙酸、吲哚乙酸3种植物生长调节剂对双红葡萄扦插育苗的作用。结果表明, 500 mg/L 吲哚丁酸处理、2 000 mg/L 吲哚乙酸处理的扦插苗成活率最高, 达80%; 1 000 mg/L 萘乙酸处理对双红葡萄根系的生长有促进效果。

关键词: 植物生长调节剂; 葡萄; 扦插繁殖; 成活率; 影响

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2013)08-0020-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2013.08.007

植物生长调节剂的研究和应用是植物生理学和营养学中十分重要和活跃的领域^[1-2], 合理使用植物生长调节剂, 可以达到高产、优质、高效的目的。近年来, 随着果树集约化栽培模式的推广应用, 植物生长调节剂对果树生长发育的调控作用日益被重视^[3]。但由于植物生长调节剂在果树中的应用效果因药剂类型、浓度、用法、用量, 以及果树品种, 生长状况等不同而表现出较大的差异, 如使用不当, 会产生相反的效果, 影响果品的产量和品质^[4-5]。为此,

我们试验观察了不同浓度的IBA(吲哚丁酸)、NAA(萘乙酸)、IAA(吲哚乙酸)对葡萄硬枝扦插育苗的效果, 以期筛选出适宜葡萄扦插繁殖的生长调节剂。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试药剂吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)均购自郑州信联生化科技有限公司。插条为葡萄品种双红的一年生硬枝, 由甘肃省兰州市园艺试验场提供。扦插基质为膨胀珍珠岩和

收稿日期: 2013-05-30

作者简介: 张致玺(1956—), 男, 甘肃平凉人, 高级农艺师, 主要从事园艺、果树、蔬菜研究推广工作。联系电话: (0)13893246691。

基因的特征保守序列, 测序结果同GeneBank中PVM CP基因序列[GI: 361071296]同源性达到了98.97%, 即成功克隆到了PVM基因片段, 这也是首次从甘肃河西走廊感病区人参果中检测出PVM。2) 马铃薯M病毒发现于美国、法国、英国、德国、荷兰等国家, 目前在世界各地均有发生。我国于1978年在黑龙江省农业科学院克山马铃薯研究所首次发现PVM, 现已有多个地区报道^[7]。PVM是香石竹潜隐病毒属成员^[8], 病毒粒体大小为650 nm × 12 nm^[9], 体外保毒期为5~7 d, 在寄主植物的任何部位都可检测到病毒, 病毒主要存在于细胞质中^[6]。该研究结果可为人参果、马铃薯等脱毒种苗的检验检疫和PVM病毒病的同期检测提供新的诊断方法。

参考文献:

- [1] 于晓芳, 薛凤波. 人参果的开发前景及栽培技术[J]. 黑龙江生态工程职业学院报, 2007, 20(1): 26-27.
- [2] 郭兴启, 温孚江, 宋云枝, 等. 翻译和非翻译马铃薯Y病毒外壳蛋白基因介导的抗病性比较[J]. 病毒学报, 2001, 17(4): 360-367.
- [3] 竺晓平, 朱常香, 宋云枝, 等. CP基因3'端短片段介导的对马铃薯Y病毒的抗性[J]. 中国农业科学, 2006, 39(6):

1153-1158.

- [4] 朱玉贤, 李 毅. 现代分子生物学(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 179-180.
- [5] BEACHY R N, LOESCH-FRIES S, TUMER N E. Coat protein-mediated resistance against virus infection[J]. Annual Review of Phytopathology, 1990, 28(1): 451-472.
- [6] 刘一佳, 李 丽, 刘 涛, 等. 绣线菊属植物的DNA提取和RAPD引物筛选[J]. 甘肃农业科技, 2009(7): 17-18.
- [7] 牛颜冰, 郭失迷, 宋艳波, 等. RNA沉默—新型的植物病毒病害防治策略[J]. 中国生态农业学报, 2005(13): 47-51.
- [8] SANFORD J C, JOHNSTON S A. The concept of parasite-derived resistance—deriving resistance genes from the parasite's own genome[J]. Journal of Theoretical Biology, 1985, 113(2): 395-405.
- [9] POWELL ABEL P, NELSON R S, DE B, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232, (4751): 738-743.

(本文责编: 杨 杰)