

菊花上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴定

Serological detection and molecular identification of *Tomato spotted wilt virus* in chrysanthemum郭京泽¹ 胡佳续¹ 王仲敏¹ 刘 梅² 李兴红^{2*} 王万骞¹

(1. 中华人民共和国天津海关, 天津 300461; 2. 北京市农林科学院, 植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

Guo Jingze¹ Hu Jiaxu¹ Wang Zhongmin¹ Liu Mei² Li Xinghong^{2*} Wang Wanqian¹

(1. Tianjin Custom District P. R. China, Tianjin 300461, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

菊花是一种重要的花卉和药用植物,受到病害侵染时,其会失去观赏价值。目前我国报道的侵染菊花的病毒种类主要有菊花B病毒(*Chrysanthemum virus B*, CVB)、番茄不孕病毒(*Tomato aspermy virus*, TAV)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)等。近年来,在北京市菊花产区发现,部分菊花植株有被番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)侵染的疑似症状。为确定该产区菊花是否受到TSWV危害,利用TSWV的特异抗体和引物,采用双夹心酶联免疫吸附测定(double antibody sandwich assay, DAS-ELISA)方法和反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)技术对采自北京市顺义区的13份菊花样品进行检测,建立了适宜的反应体系和扩增程序,以期对TSWV的防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2017年在北京市顺义区菊花栽培基地发现菊花植株上出现矮化、褪绿和萎蔫等症状,采集了13份菊花植株样品,其中5份幼苗,8份成苗,品种包括黄丹特、领英、绿宝石、马蒂斯、斯翠莎、科斯泰利、罗伊斯、丹特瑞德斯特,于-20℃冰箱保存。

试剂及仪器:TSWV阳性样品和DAS-ELISA检测试剂盒,美国ACD公司;RNeasy Plant Mini Kit核酸提取试剂盒,德国QIAGEN公司;PrimeScript One Step RT-PCR Kit核酸扩增试剂盒,日本TaKaRa公司;V063-R1-TSWV特异性抗体,美国ACD公司。

Multiskan FC酶标仪,美国Thermo Scientific公司;Smart Cycler PCR仪,美国Cepheid公司。

1.2 方法

TSWV特异引物:TSWV-Cpo-F(5'-ATGTCTA-AGGTTAAGCTCACTA-3')/TSWV-Cpo-R(5'-AGA-AGTTCTGCGAGTTTTC-3')(孙森等,2017);L1-TSWV(5'-AATTGCCTTGCAACCAATTC-3')/L2-TSWV(5'-ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3')(Stanković et al.,2013),由上海英骏生物技术有限公司合成。

DAS-ELISA:利用TSWV特异性抗体对13份菊花样品进行DAS-ELISA检测;将菊花样品研磨并加入抽提缓冲液,样品重量与抽提缓冲液体积比为1:10。在酶联板上设定待检样品孔和对照孔,感染TSWV植物材料作为阳性对照,健康植物材料作为阴性对照,抽提缓冲液作为空白对照。操作步骤参照试剂盒说明书,当样品吸光值 $OD_{405\text{ nm}} > 2$ 倍阴性 $OD_{405\text{ nm}}$ 时,样品被判定为阳性,否则为阴性。

RT-PCR:选取DAS-ELISA检测呈阳性的菊花样品进行TSWV鉴定。将待测菊花样品研磨后,取100 mg按照试剂盒说明书提取总RNA。RT-PCR反应程序:50℃预热30 min;94℃预变性2 min;94℃变性30 s;55℃退火30 s;72℃延伸30 s;返回第3步共40个循环。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

序列比对与系统进化分析:扩增产物送上海英骏生物技术有限公司克隆测序,所得序列利用CodonCode软件进行装配;利用MEGA 6.0软件基于邻接法构建系统发育树并进行聚类分析,自展检验重复1 000次。

基金项目:北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20170709)

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: lxh1962@yahoo.com.cn

收稿日期:2017-08-01

2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA检测结果

在13份菊花样品中8份样品被检测为阳性,阳性样品均为菊花成苗,5份样品被检测为阴性,阴性样品均为菊花幼苗。

2.2 RT-PCR 鉴定结果

利用Cpo-F/Cpo-R引物和L1/L2引物对DAS-ELISA阳性样品进行RT-PCR鉴定,结果显示黄丹特、领英、绿宝石、马蒂斯菊花品种分别能扩增出750、270 bp特异性片段,阴性对照均无条带(图1)。

2.3 序列比对与系统进化分析

将L1/L2引物扩增的产物进行克隆测序,序列长度为277 bp。序列比对结果显示,顺义区菊花分离物与TSWV核酸序列有较高的相似性,其与GenBank中1个中国和11个国外分离物的序列相似性为96%~98%,与俄罗斯莴苣 *Lactuca sativa* 分离物

(JX452818.1)的相似性最高,为98%(图2)。

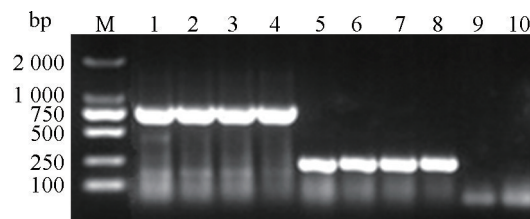


图1 2对特异引物对4种菊花样品的RT-PCR扩增结果

Fig. 1 RT-PCR analysis of four species of chrysanthemum samples with two pairs of specific primers

M: DNA2000 DNA marker; 1~4为黄丹特、领英、绿宝石、马蒂斯的Cpo-F/Cpo-R扩增产物; 5~8为黄丹特、领英、绿宝石、马蒂斯的L1/L2扩增产物; 9: 阴性对照; 10: 空白对照。M: DL2000 DNA marker; 1~4: amplification of Yellow Dante, LinkedIn, Emerald, Matisse with Cpo-F/Cpo-R primer; 5~8: amplification of Yellow Dante, LinkedIn, Emerald, Matisse with L1/L2 primers; 9: negative control; 10: water control.

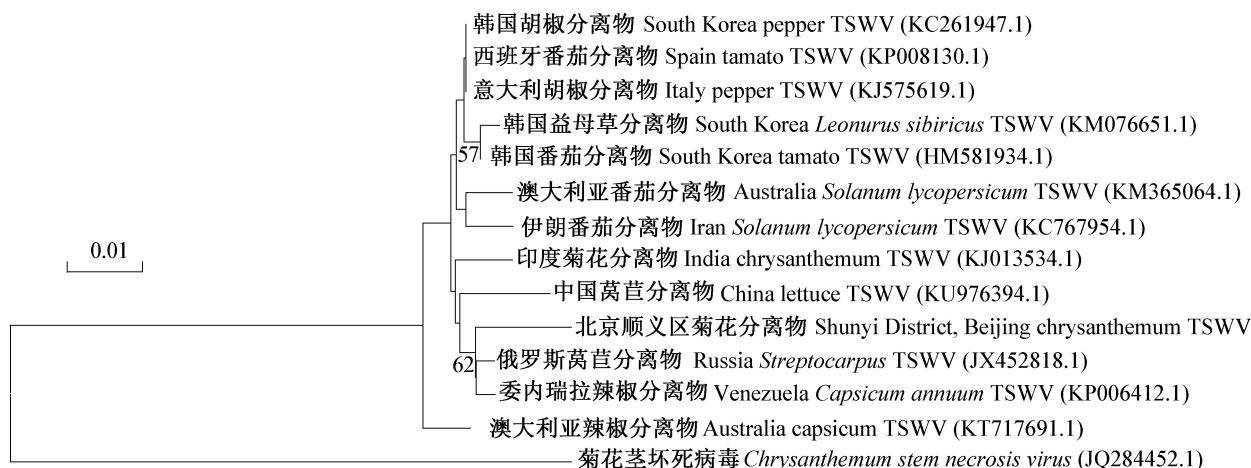


图2 基于邻接法的北京市顺义区菊花分离物与其它TSWV分离物的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of chrysanthemum isolated from Shunyi District, Beijing City and other TSWV isolates based on neighbor-joining method

3 讨论

TSWV是一种分布广泛的植物病毒,近些年我国多次出现其侵染番茄、青椒等农作物的报道(李洁等,2017)。TSWV寄主种类繁多,基因变异速率快,血清学方法难以对其病毒株系进行准确鉴定。本研究利用2对特异性引物,通过基因序列比较对侵染北京市顺义区菊花的病原分离物进行了鉴定。目前国内鲜有TSWV侵染菊花的报道,该病毒的来源地以及传播途径还需深入追溯探讨。

参考文献 (References)

Li J, Chi SQ, Yang QM, Ding TB, Chu D. 2017. Identification of Toma-

to spotted wilt virus disease in Shandong, Cina. Plant Protection, 43(1): 228-232 (in Chinese) [李洁, 迟胜起, 杨勤民, 丁天波, 褚栋. 2017. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病害. 植物保护, 43(1): 228-232]

Stanković I, Bulajić A, Vučković A, Ristić D, Milojević K, Nikolić D, Krstić B. 2013. First report of Tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Serbia. Plant Disease, 97(1): 150

Sun M, Jing CC, Chu CR, Wu GT, Sun XC, Xie Y, Liu Y, Qing L. 2017. Serological detection and molecular identification of Tomato spotted wilt virus in pepper in Chongqing. Acta Horticulturae Sinica, 44(3): 487-494 (in Chinese) [孙森, 荆陈沉, 楚成茹, 吴根土, 孙现超, 谢艳, 刘勇, 青玲. 2017. 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴定. 园艺学报, 44(3): 487-494]

(责任编辑:张俊芳)