

烟草马铃薯X病毒(Potatoes Virus X, PVX)快速检测方法及其抗性诱导物质抑制效果研究

匡传富¹, 孙现超², 陈德鑫³

¹湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

²西南大学, 重庆

³中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

Email: kcf601@163.com

收稿日期: 2020年9月3日; 录用日期: 2020年9月16日; 发布日期: 2020年9月23日

摘要

对注射PVX后烟苗的发病症状; 总RNA快速检测PVX侵染烟草叶片的方法; 注射抗病毒抗性诱导物质处理后周围病斑扩散情况; 摩擦法接种抗性诱导物质效果等方面进行了研究。结果表明: 注射1周后观察云烟叶片, PVX在云烟中可产生严重的花叶症状, PVX在云烟中表达成功; 提取RNA, 利用病毒的引物检测PVX病毒的纯度, 经检测RNA OD_{260/280} = 1.955, C = 755.89 ng/μL, 说明发病叶片是由纯的PVX引起; 注射1 d后用抗性诱导物质比施壮处理叶片, 2 d后利用UV光照射并拍照, 发现经比施壮处理后, 病毒扩散斑明显小于非施用处理; 在抗性诱导物质胁迫下, 病毒复制效率运动扩散能力都有所降低, 抗性诱导物质处理后的叶片荧光斑虽有所扩大, 但病毒尚未发生明显转移。由此可见: 提取侵染烟草叶片总RNA进行PVX纯度检测, 可灵敏地检测出马铃薯X病毒, 可作为快速评价感染马铃薯X病毒的指标。抗性诱导物质(比施壮)可抑制马铃薯X病毒的扩散。

关键词

烟草, 马铃薯X病毒, 快速评价, 抗性诱导物质, 抑制效果

Rapid Detection Method of Tobacco Potato Virus X (PVX) and Study on the Inhibitory Effect of Resistance Inducer

Chuanfu Kuang¹, Xianchao Sun², Dexin Chen³

¹Chenzhou Company, Hunan Tobacco Company, Chenzhou Hunan

²Southwest University, Chongqing

³Research Institute of Tobacco, China Academy of Agricultural Sciences, Qingdao Shandong

Email: kcf601@163.com

文章引用: 匡传富, 孙现超, 陈德鑫. 烟草马铃薯X病毒(Potatoes Virus X, PVX)快速检测方法及其抗性诱导物质抑制效果研究[J]. 农业科学, 2020, 10(9): 733-740. DOI: 10.12677/hjas.2020.109111

Abstract

The symptoms of tobacco seedlings after injection of PVX, the method of rapid detection of total RNA PVX infection of tobacco leaves, the diffusion of surrounding spots after treatment with antiviral resistance inducers, and the effect of friction inoculation resistance inducers were studied. The results showed that PVX could produce serious mosaic symptom in tobacco leaves after one week of injection; PVX was successfully expressed in tobacco leaves; RNA was extracted; the purity of PVX virus was detected by using the primers of virus; and the RNA $OD_{260/280} = 1.955$, $c = 755.89$ ng/ μ L was detected. The results showed that the infected leaves were caused by pure PVX. The virus spreading spot was smaller after 1 d treatment than that after 2 d treatment by UV irradiation and photo-taking. Under the stress of resistance inducer, the virus replication efficiency, movement and diffusion ability were all decreased, and the fluorescence spot of leaves treated by resistance inducer was enlarged, but the virus had not been transferred obviously. The results showed that PVX virus could be detected sensitively by extracting total RNA from tobacco leaves, which could be used as a rapid index to evaluate the infection of PVX virus. The resistance inducer (Bz) could inhibit the spread of potato X virus.

Keywords

Tobacco, Potato Virus X, Rapid Evaluation, Resistance Inducer, Inhibitory Effect

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

马铃薯 X 病毒是 Potexvirus 属的典型成员, 是危害茄科作物的一种重要病毒。马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒复合侵染大田的马铃薯, 表现为粗缩花叶、条纹花叶、叶皱而小、坏死、病株矮化[1]。建立一种对马铃薯 X 病毒快速检测体系, 是快速识别马铃薯 X 病毒, 和快速采取措施防治马铃薯 X 病毒有效手段。尚晓楠[2]等建立了特异性检测 PVX 的实时荧光定量 PCR 体系检测, 马铃薯 X 病毒, 成功检测到以含 pCaPVX440 侵染性克隆载体的农杆菌 C58C1 接种后的本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中 PVX 病毒 RNA。冯光惠等[3]得出 RT-PCR 方法可快速、准确地检测到马铃薯 X 病毒。雷新云等[4]用抗性诱导物质 NS-83, 具有体外钝化 TMV、抑制 TMV 初侵染的作用, 经根部吸收可降低叶部的侵染; 可诱导与抗性相关的细胞分裂素和过氧化物酶活性的增加。在不同地区的番茄、辣椒、烟草上, NS-83 均具有降低发病率的抑制侵染作用和压低病情指数的治疗作用。本试验探讨了用总 RNA 进行 PVX 烟草内马铃薯 X 病毒感染情况快速检测的方法, 并探讨抗性诱导物质比施壮对马铃薯 X 病毒的抑制效果。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 植物材料

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)种子由西南大学植物保护学院植物病理实验室提供, 光照培养室培养。

2.1.2. 毒源材料

马铃薯 X 病毒(Potatoes virus X, PVX)毒源为西南大学植物保护学院植物病。毒实验室保存的含有 PVX-GFP 病毒全长质粒的农杆菌菌液。

2.1.3. 生化试剂

RT-PCR 反应试剂购自 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司), 通用型 DNA 纯化回收试剂盒(购自天根生化科技有限公司), 比施壮(重庆市优胜科技发展有限公司)。

2.1.4. PCR 引物

本研究中所用到的引物由 Invitrogen 公司合成, 序列如下表 1。

Table 1. The primer of PVX CP and virus primers used commonly in laboratory
表 1. PVX 外壳蛋白区域引物及实验室常用病毒引物

Primer	Primer sequences (5'-3')	
PVX-CP-F	GGCTCGAGATGTCTTACAGTATCACTAC	723 bp
PVX-CP-R	CCGGATCCTGGGCCCTACCGGGGGTAA	
TMV-F	CAGCTGCTATTGACCTTGAAAC	1515 bp
TMV-R	CAATATCAATGATGCCAGAC	
CMV-F	GATAAGAAGCTTGTTTCGCG	322 bp
CMV-R	GCTCGATGTCGACATGAAGT	
TuMV-F	GTGCATTGAGAACGGAACCTC	413 bp
TuMV-R	GATTAACGTCCTCGGTGVTATG	
PVY-F	GCGCGGATCCGCAAATGACACAATGGCATGCAG	825 bp
PVY-R	GCGCGGTACCTCACATGTTCTTGACTCCAAGT	

注: 表中退火温度为 62℃。

2.2. 方法

2.2.1. PVX 纯病毒毒源的活化

将实验室保存在-80℃含 PVX 全长载体的农杆菌菌液活化, 并注射到烟草中获得单一毒源。具体操作步骤如下:

- 1) 从-80℃冰箱中取出含 PVX 全长载体的农杆菌菌液 5 μL。
- 2) 将 5 μL 菌液加入 5 mL 含有卡那霉素和链霉素 YEP 培养基中, 225 rpm/min, 30℃, 培养 12~16 h。
- 3) 从 5 mL 菌液中取 1 mL 加入浓度为 20 μM 的乙酰丁香酮(AS)5 μL, 加入到 25 mL 含有卡那霉素和链霉素 YEP 培养基中 225 rpm/min, 30℃培养 12~16 h。
- 4) 从 25 mL 农杆菌菌液中取 2 mL 加入到 50 mL 离心管中, 室温, 5000 rpm/min 离心 15 min, 弃上清。
- 5) 将沉淀用新配置的缓冲液重悬并调节 OD₆₀₀ 值至 1.0~1.2, 室温静置 3 h。

缓冲液配方 100 mL 体系:

MgCl ₂ (1 M)	1 mL	} 加灭菌水至 100 mL
MES (0.5 M)	2 mL	
AS (100 mM)	100 μL	

- 6) 取培养至 5~6 叶期生长健壮的本氏烟, 在叶片背面用针头打一小孔, 用去掉针头的 2.5 mL 离心

管吸取农杆菌悬浮液注射到叶片内。

注射时带一次性手套，防止交叉污染。

2.2.2. 注射一周后观察症状并提取烟草中病毒总 RNA

采用重庆升博公司的 RNA 提取试剂盒提取。

- 1) 称取 0.1~0.2 g 样品放入研钵。
- 2) 将 500 μL RLT 和 50 μL Plantaid 放入 1.5 mL 离心管中。
- 3) 用液氮研磨样品至细粉转入离心管内，立即剧烈震荡 20 S，放入 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中 3 min。
- 4) 将离心管从水浴锅中取出立即涡旋 30 S，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13,000 rpm 离心 10 min，将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入 0.5 体积的无水乙醇。
- 5) 将混合液加入到吸附柱中(每次小于 750 μL)，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 13,000 rpm 离心 2 min，弃废液。
- 6) 在吸附柱中加入 700 μL 去蛋白液 RW1，室温放置 30 S，13,000 rpm 离心 30S，弃废液。
- 7) 在吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 RW，13,000 rpm 离心 30 S，弃废液并重复一次。
- 8) 将吸附柱放入收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，弃废液。
- 9) 将吸附柱放入一新 1.5 mL 离心管中室温放置 1 min，加入温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ ~80 $^{\circ}\text{C}$ 的 RNase-free water 30~50 μL ，13,000 rpm 离心 2 min。
- 10) 弃吸附柱，收集样品，并用 2% 琼脂糖凝胶检测提取结果，利用 Goldview 染色，用凝胶成像仪观察电泳结果。

2.2.3. RT-PCR

将提取的 RNA 利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 进行反转录，试剂盒购自 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司)。

RT 体系:

5 \times Prime Script Buffer	2 μL
PrimeScript RT Enzyme	0.5 μL
Oligo dT Primer	0.5 μL
Random 6 mers	0.5 μL
Total RNA	2.5 μL
RNase-free ddH ₂ O	up to 10 μL

RT 程序为:

37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 20S

PCR 检测:

利用实验室常见病毒引物进行 PCR 的扩增。

扩增体系:

10 \times ExBuffer	2.5 μL
MgCl ₂	1.5 μL
dNTP	0.5 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
ExTaq酶	0.3 μL
cDNA	1.5 μL
ddH ₂ O	up to 25 μL

扩增条件:

94°C	3 min	} 30 cycles
94°C	45 s	
56°C	45 s	
72°C	90 s	
72°C	延伸10 min	

电泳后用浓度为 1% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, Goldview 染色, 用凝胶成像仪观察电泳结果。

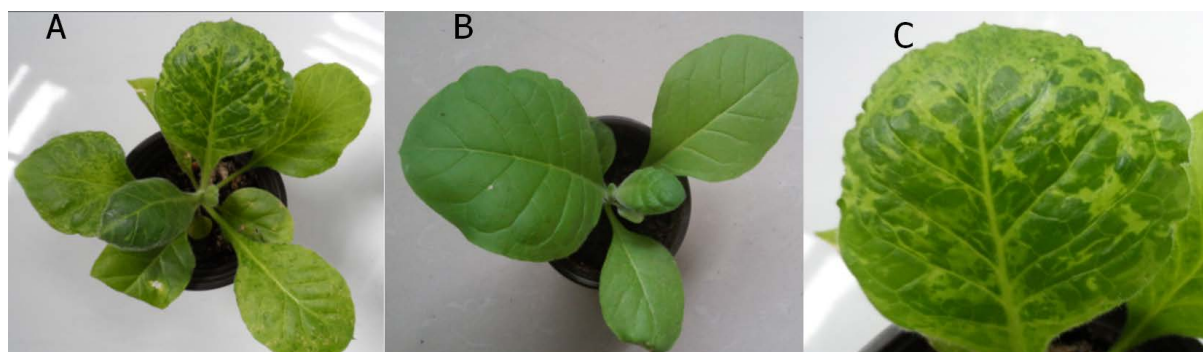
2.2.4. 快速评价体系建立方法

- 1) 将含有的 PVX-GFP 载体的农杆菌菌液注射到本氏烟中。
- 2) 注射 48 h 之后利用共聚焦显微镜观察 PVX-GFP 在本氏烟中的表达情况。
- 3) 重新注射并在 1 d 后在注射叶片喷比施壮, 3 d 后利用 UV 灯观察注射点周围病毒扩散情况并拍照。
- 4) 另取一批苗子注射后喷清水作对照, 同样利用 UV 灯观察并拍照, 测定病毒扩增直径。
- 5) 利用半叶法将含有 GFP 标记病毒的叶片摩擦接种到健康烟苗中喷药并设置清水对照, 观察喷药前后荧光斑点大小及数量。

3. 结果与分析

3.1. 注射 PVX 后烟苗的发病症状

为确定注射后 PVX 是否在云烟中表达, 我们在注射 1 周后观察云烟叶片, PVX 在云烟中可产生严重的花叶症状, 1 周后在非注射叶的叶片中观察到严重的花叶症状, 初步证明 PVX 在云烟中表达成功(图 1)。



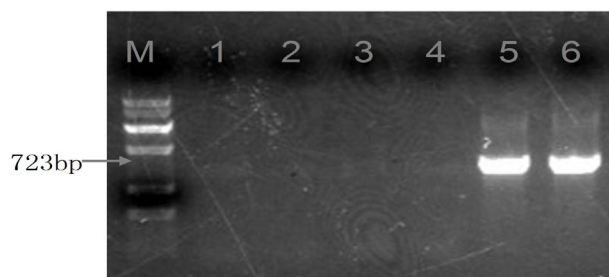
注: A: 注射一周后全株症状; B: 为健康对照; C: 注射一周后叶症状。

Figure 1. Mosaic symptom caused by PVX on cloud

图 1. 云烟上 PVX 引起的花叶症状

3.2. PVX 侵染烟草叶片总 RNA 的提取及 PVX 纯度检测

将症状明显的云烟叶片取样, 提取 RNA, 并利用实验室常见其他病毒的引物检测 PVX 病毒的纯度。经检测 $RNA\ OD_{260/280} = 1.955$, $C = 755.89\ ng/\mu L$ 可用于后续实验。图 2 为利用多种病毒的特异性引物检测注射后 PVX 纯度, 结果可知只有 PVX 引物产生条带, 证明发病叶片是由纯的 PVX 引起, 可用于后续接种。



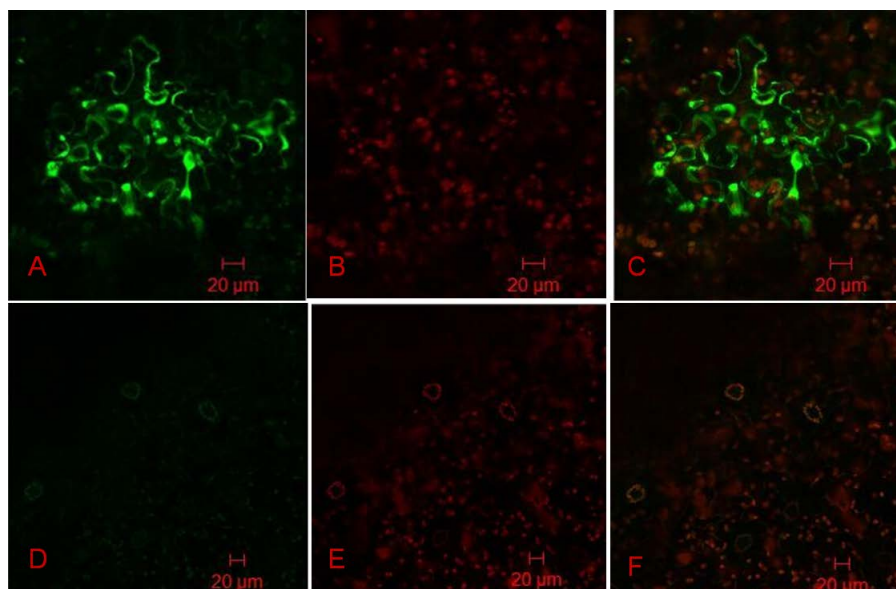
注: 1: TMV; 2: CMV; 3: TuMV; 4: PVY; 5: PVX; 6 阳性对照; M 为 Marker V。

Figure 2. Detection of several virus coat proteins by RT-PCR with specific primers

图 2. 几种病毒外壳蛋白特异性引物 RT-PCR 检测

3.3. 在共聚焦显微镜下观察 PVX-GFP 的表达情况

在共聚焦显微镜下观察到 PVX-GFP 在烟草细胞中具有较高的表达量, 如图 3, 而对照组则没有荧光现象发生, 因此可知该载体表达情况较好能够用于下一步实验。



注 1: A、D: PVX-GFP 处理和对照植物的荧光斑点; B、E: 叶肉中叶绿素自发荧光; C、F: 细胞中 GFP 及叶肉中叶绿素荧光叠加。注 2: 图中放大倍数为 800 倍。

Figure 3. Expression of PVX-GFP in tobacco leaves mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

图 3. 农杆菌介导 PVX-GFP 在烟草叶片中表达

3.4. 用抗病毒抗性诱导物质处理后注射点周围病斑扩散情况

注射 1 d 后用比施壮处理叶片, 对照利用清水处理, 2 d 后利用 UV 光照射并拍照, 观察荧光斑扩散情况, 并与空白对照做对比, 发现经比施壮处理后, 病毒扩散斑小于清水对照, 见图 4。

3.5. 摩擦法接种抗性诱导物质效果分析

烟草摩擦接种携带 GFP 的病毒, 接种后利用比施壮处理, 2 d 后观察结果(图 5), 比施壮处理的植株上病毒荧光斑点与清水处理相比, 单斑荧光面积明显小, 并且荧光强度明显弱。表明在抗性诱导物质

迫下病毒复制效率运动扩散能力都有所降低,而第3 d 观察后可明显观察到清水处理植株荧光斑点扩大,并且病毒已经移动至植株根部随液流转移至新叶。而抗性诱导物质处理后的叶片荧光斑虽有所扩大,但病毒尚未发生明显转移。

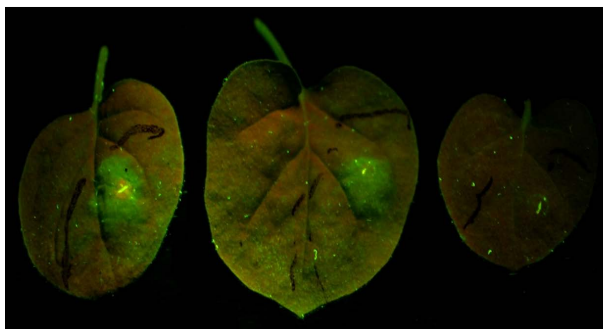
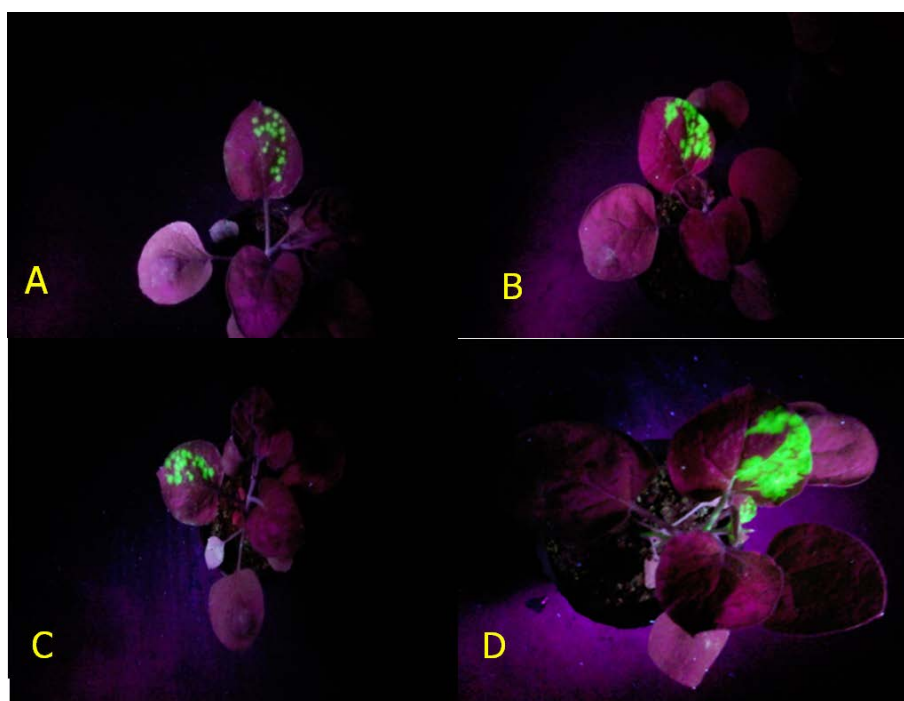


Figure 4. Diffusion of fluorescent spots (from left to right in order of clear water control, Bishizhuang treatment, blank control)

图 4. 荧光斑点扩散情况(自左到右依次为清水对照, 比施壮处理, 空白对照)



注: A、C: 比施壮处理 2 d、3 d 后荧光斑点; B、D: 清水对照 2 d、3 d 后荧光斑点。

Figure 5. Virus fluorescent spots under UV light

图 5. 紫外灯照射下的病毒荧光斑点

4. 讨论

1) 将含有的 PVX-GFP 载体的农杆菌菌液注射到本氏烟中,在共聚焦显微镜下观察到, PVX-GFP 在烟草细胞中具有较高的表达量,而对照组则没有荧光现象发生。

2) 烟草摩擦接种携带 GFP 的病毒,接种后利用比施壮处理,2 d 后观察结果,比施壮处理的植株上

病毒荧光斑点与清水处理相比, 单斑荧光面积明显小, 并且荧光强度明显弱。表明在抗性诱导物质胁迫下, 病毒复制效率运动扩散能力都有所降低。植株根部随液流转移至新叶, 而抗性诱导物质处理后的叶片荧光斑虽有所增长, 但病毒尚未发生明显转移。

3) 植物抗性诱导物质室内筛选过程中, 为了更好地明确植物病毒抑制的效果, 通常都是用单一的纯病毒来作为研究对象。由于烟草病毒种类繁多, 多种病毒复合侵染现象十分严重, 导致病毒病症状表现更加复杂, 在四川、云南、湖南等烟叶主产区均有相关报道。病毒的复合侵染会对植物症状产生较大影响, 甚至能改变发病症状, 使我们不能准确记录 PVX 纯病毒侵染烟苗后的症状, 并且两种复合侵染还可能会在植物体中产生协同或拮抗作用, 影响病毒在植物体中的传播。为了保证实验结果的可靠性, 本实验利用实验室已保存的含有 PVX-GFP 瞬时表达载体的农杆菌菌液, 注射到本氏烟中, 利用多种实验室常见病毒特异性引物检测农杆菌注射后病毒纯度, 结果表明, 我们通过该方法获得了 PVX 病毒的纯毒源。因此该方法可有效防止病毒毒源在保存或后期接种过程中的交叉感染以及病毒在反复接种传代过程中的致病性变异, 确保后续实验结果的准确性。

4) 本试验先利用共聚焦显微镜观察注射后烟苗确定 PVX-GFP 能够在本氏烟中大量表达, 可知该毒源可应用到抗性诱导物质快速评价体系构建的实验中去。该体系能够快速直观地在实验室中观察到抗性诱导物质对病毒扩散过程中的抑制效果, 我们利用一般寄主的汁液摩擦法进行实验, 结果也再次验证了本方法室内筛选植物抗性诱导元素的可靠性。传统的抗性诱导物质评价系统使用半叶法[5], 利用枯斑寄主接种观察, 耗时长大约需要 7~10 天, 并且要求必须是病毒的枯斑寄主, 而本实验只需 3~5 天即可, 且任何繁殖寄主均可以用来实验。

5) 本试验确立了一种实验室中新的评价体系思路, 并为以后建立完善的抗性诱导物质药效评价体系奠定了基础。

基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号: 14-16ZDAa02)。

参考文献

- [1] 朱贤朝, 等. 主编. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 尚晓楠, 吴蓓蕾. 马铃薯 X 病毒荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用[J]. 植物保护, 2016, 42(3): 165-169.
- [3] 冯光惠, 杜虎平, 李夏隆, 亢福仁. 陕北地区马铃薯 X 病毒 CP 基因的 RT-PCR 检测及其序列分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(9): 91-96.
- [4] 雷新云, 李怀方, 裘维蕃. 植物诱导抗性对病毒侵染的作用及诱导物质 NS-83 机制的探讨[J]. 中国农业科学, 1987, 20(4): 1-6.
- [5] Zhao, L., Hao, X.G. and Wu, Y.F. (2015) Inhibitory Effect of Polysaccharide Peptide (PSP) against *Tobacco mosaic virus* (TMV). *International Journal of Biological Macromolecules*, **75**, 474-478. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.058>