

# 陕西马铃薯卷叶病原的分子生物学鉴定

颜永杰<sup>a</sup>, 吴 宽<sup>b</sup>, 谢海峰<sup>a</sup>, 高云芳<sup>a</sup>

(西北大学 a 生命科学学院, b 信息科学与技术学院, 陕西 西安 710069)

**【摘要】**【目的】对陕西榆林疑似感染马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)的病株毒源进行分子生物学鉴定,为陕西省马铃薯卷叶病的防治提供参考。【方法】根据 GenBank 数据库已报道的马铃薯卷叶病毒外壳蛋白(Coat protein, CP)基因序列设计了 1 对引物,利用 RT-PCR 技术成功扩增了陕西 PLRV·CP 基因,然后进行克隆、测序,并与 GenBank 中已报道的 27 个 PLRV 分离物的 CP 基因进行同源性分析。【结果】获得的陕西 PLRV·CP 基因大小为 627 bp,含有 1 个 ORF,编码 208 个氨基酸的多肽,其与已报道的 27 个国内外 PLRV·CP 高度同源。【结论】陕西榆林的疑似病株确定为感染 PLRV 的马铃薯病株。

**【关键词】** 马铃薯卷叶病;马铃薯卷叶病毒;RT-PCR;分子生物学鉴定

**【中图分类号】** S435.32;S432.4<sup>+</sup>1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2010)05-0087-06

## Molecular biological identification of potato leafroll virus from field samples in Shaanxi

YAN Yong-jie<sup>a</sup>, WU Kuan<sup>b</sup>, XIE Hai-feng<sup>a</sup>, GAO Yun-fang<sup>a</sup>

(a College of Life Sciences, b College of Information Science and Technology, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

**Abstract:** 【Objective】The study was to identify samples of potato leafroll diseases from Shaanxi to provide theoretical reference for the control of potato leafroll diseases. 【Method】Using specific primers designed according to the converted sequences of potato leafroll virus(PLRV) on GenBank, the reaction of RT-PCR was used to obtain virus CP gene, to conduct sequence analysis and homological comparison. 【Result】A 627 bp fragment of CP including an open reading frame coding for 208 amino acids was successfully amplified by this RT-PCR system, and it possessed a very high similarity with previously reported 27 isolates of PLRV·CP. 【Conclusion】Molecular investigation indicates that the potato leafroll diseases from field samples was infected by potato leafroll virus in Shaanxi.

**Key words:** potato leafroll disease; potato leafroll virus; RT-PCR; molecular biological identification

马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)在全世界马铃薯种植区广泛发生,是导致马铃薯严重减产的世界性病毒病害,一般可造成 30% 以上的产量损失,严重的再次感染可减产 80%<sup>[1]</sup>。目前,我国已对云南、贵州、内蒙古、福建、青海、甘肃、广东、河北等省区的 PLRV 进行了检测,有些还对 PL-

RV 不同分离物之间的同源性进行了进一步分析<sup>[2-10]</sup>,为研究鉴定 PLRV 及其变异提供了理论基础。马铃薯作为重要的粮食、蔬菜兼用的经济作物,是陕西省仅次于小麦、玉米的第 3 大农作物,主要分布在陕北、陕南地区,种植面积 26.7 ~ 30.6 万 hm<sup>2</sup><sup>[11-12]</sup>。但目前陕西马铃薯品种多而混杂,各

\* [收稿日期] 2009-11-06

[基金项目] 西北大学国家大学生创新性实验计划项目(091069702)

[作者简介] 颜永杰(1989-),男,陕西扶风人,本科,主要从事生物科学研究。E-mail: yanyongjie2007@yahoo.cn

[通信作者] 高云芳(1958-),女,陕西韩城人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物生理生化研究。

E-mail: gaoyunf@nwu.edu.cn

种病害蔓延<sup>[13]</sup>是马铃薯生产中亟待解决的问题。其中疑似感染 PLRV 的马铃薯卷叶病害,近年来在陕西马铃薯产区多有发生,导致马铃薯产量和品质下降。为此,本研究采用 RT-PCR 扩增技术<sup>[2,7]</sup>,对采自陕西榆林的疑似感染 PLRV 的马铃薯卷叶病害样品进行分子生物学鉴定,以期为马铃薯卷叶病害的防治以及农业增效和农民增收奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病株 马铃薯卷叶病疑似病株,由榆林市农业科学研究所协助,采自定边县马铃薯田。其中,布尔班克品种疑似病株 2 个,费乌瑞它、紫花白品种疑似病株各 1 个,均表现出不同程度的卷叶症状。同时采得上述品种健康植株各 1 个,作为对照样。取各样品叶片保存于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.1.2 酶及试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自 MBI 公司,胶回收试剂盒购自北京 BIOTEKE 公司,pMD 18-T simple vector 购自大连 TaKaRa 公司,PCR DNA Ladder 购自金思特科技(南京)有限公司,*E. coli* JM109 菌株为实验室保存。

### 1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 数据库已报道的若干 PLRV 序列(GenBank 登录号:FJ859025 等)设计了 1 对 PLRV 外壳蛋白基因引物,由金思特科技(南京)有限公司合成。引物序列如下:PLRV CPF1( $5' \leftarrow \text{AT-GAGTACGGTTCGTGGTTAA} \rightarrow 3'$ ),共 20 bp;PLRV CPR1( $5' \leftarrow \text{CTATTTGGGGTTTTGCAAAG} \rightarrow 3'$ ),共 20 bp。

### 1.3 马铃薯病株叶片总 RNA 的提取

将马铃薯卷叶病疑似病株叶片在液氮中迅速研磨成粉末<sup>[14]</sup>,称取 150 mg 粉末于离心管中,加入 RNA 抽提液 500  $\mu\text{L}$ ,酚和氯仿各 250  $\mu\text{L}$ ,剧烈震荡混匀,在低温离心机中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入酚和氯仿各 250  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀,在低温离心机中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积异丙醇, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  沉淀 4 h;将沉淀后的上清液取出,在低温离心机中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min;弃上清,沉淀用乙醇(RNA 专用)洗涤后,在低温离心机中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,沉淀再用乙醇(RNA 专用)洗涤后,在低温离心机中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 3 min;固定在泡沫板上,置于超净台上风干 10 min;将沉淀溶于 30  $\mu\text{L}$  灭菌的 1%

DEPC 处理的双蒸水(DEPC 水)中,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。健康对照植株总 RNA 按上述方法提取。

制备 1.0% 琼脂糖凝胶,在电泳仪中电泳约 30 min,溴化乙啶(EB)染色后,在紫外成像系统中成像,检测所提取的总 RNA。用核酸和蛋白浓度检测仪,在波长 260 nm 和 280 nm 测定 OD 比值。

### 1.4 马铃薯病株叶片总 RNA 的 RT-PCR 扩增

1.4.1 反转录 在 PCR 小管中加入提取的马铃薯总 RNA 1  $\mu\text{L}$ 、下游引物 PLRV CPR1 0.5  $\mu\text{L}$ 、DEPC 水 3.5  $\mu\text{L}$ , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,再迅速放置冰浴中 5 min;取出 PCR 小管,加入  $5\times$  反转录酶 Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu\text{L}$ 、RNA 酶抑制剂 0.25  $\mu\text{L}$ 、M-MLV 反转录酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、DEPC 水 1.75  $\mu\text{L}$ , $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min(水浴及灭活可在 PCR 仪中完成),合成 cDNA。

1.4.2 PCR 扩增 在 PCR 小管中加入反转录得到的 cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,灭菌的双蒸水 15.4  $\mu\text{L}$ , $10\times$  *Taq* DNA 聚合酶 Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物 PLRV CPF1 和 PLRV CPR1 各 0.5  $\mu\text{L}$ ,*Taq* DNA 聚合酶 0.1  $\mu\text{L}$ ,反应体系共 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,共进行 34 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。然后对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 PCR 产物的连接、转化及 DNA 序列的测定

1.5.1 PCR 产物的连接与转化 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,切下目标条带,用北京 BIOTEKE 公司胶回收试剂盒回收纯化,纯化产物连接到克隆载体 pMD 18-T simple vector 中,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,PCR 法筛选阳性克隆。

1.5.2 DNA 序列的测定 PLRV·CP 基因序列测定由金思特科技(南京)有限公司完成。

### 1.6 PLRV 的同源性分析及进化树构建

采用 DNAMAN 软件,结合 GenBank 中已报道的 PLRV 分离物 CP 基因序列进行同源性分析,并构建 PLRV 系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯病株叶片总 RNA 的提取

由于 RNA 很容易被 RNase 降解,而 PLRV 在马铃薯植株中的分布又十分稀少,因此给 RNA 提取工作带来了极大难度。本研究采用改进后的方法提取到的马铃薯总 RNA,其中从布尔班克疑似病株样本中提取 RNA 的电泳图像比较清晰(图 1,泳道

1)。同样,利用此方法提取的健康马铃薯样品的总 RNA 电泳图像也比较清晰(图 1,泳道 2)。测得所提出的总 RNA 的 OD 比值( $OD_{260}/OD_{280}$ )为 1.82,说明植物组织中的总 RNA 提取较好。

### 2.2 马铃薯病株叶片总 RNA 的 RT-PCR 扩增

以马铃薯总 RNA 为模板,PLRV CPF1 及

CPR1 为引物进行反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,可见存在约 600 bp 的条带(图 2),该片段大小与文献报道的 PLRV·CP 基因大小一致,初步说明疑似病株有马铃薯卷叶病毒存在。而马铃薯健康植株中未扩增出任何条带,说明未被 PLRV 侵染。

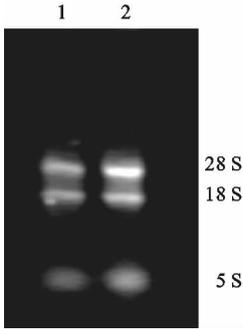


图 1 马铃薯叶片总 RNA 的电泳结果

1. 疑似病株的总 RNA;2. 健康植株的总 RNA

Fig.1 Electrophoresis of total RNA extracted from potato plant

1. Total RNA extracted from PLRV-infected potato plant;

2. Total RNA extracted from healthy potato plant

### 2.3 马铃薯卷叶病毒 DNA 序列的测定

马铃薯卷叶病毒 PCR 产物经连接、转化,PCR 法筛选阳性克隆,然后进行 DNA 序列测定,结果表

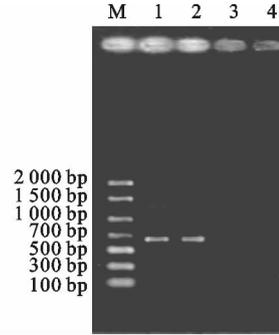


图 2 马铃薯叶片总 RNA 的 RT-PCR 产物的电泳结果

M. 标准分子量;1~2. 马铃薯病株;3~4. 健康马铃薯植株

Fig.2 RT-PCR amplification of total RNA extracted from potato plant

M. Marker;1-2. Infected potato plants;

3-4. Healthy potato plants

明,所得目的片段大小为 627 bp,含有 1 个 ORF,编码 208 个氨基酸的多肽(图 3)。

```

1  atgagtagcggtcggtgtaaaggaaa tgtcaatggtggtgtacaacaaccaagaagcga
M  S T V V V K G N V N G G V Q Q P R R R
61  agaaggcaatcccttcgcaggcgcgc taa cagagttcagccagtggttatggtcaecggcc
R  R Q S L R R R A N R V Q P V V M V T A
121 cctgggc aacccaaggcgc ccgaagacg tagaagaggaggc aatcgccgctcaagaagaa ct
P  G Q P R R R R R R R G G N R R S R R T
181 ggagttccc gaggacg aggctcaagcga gacattcgtgtttacaaggacaacc tcatg
G  V P R G R G S S E T F V F T K D N L M
241 ggc aactccc aaggaagtttcaccttcgggcc gagtctatcagactgtccggcattca ag
G  N S Q G S F T F G P S L S D C P A F K
301 gatggaatac tcaaggc ctaccatga gta taagatcaca agc atcttacttcagttcg tc
D  G I L K A Y H E Y K I T S I L L Q F V
361 agcgaggcctcttccac ctctcggctc catcgcttatgagttggacccccattgca aa
S  E A S S T S S G S I A Y E L D P H C K
421 gtatcatccc tccagte ctacgtcaa caagttccaaattacgaaggcggcgcgcaaaa ct
V  S S L Q S Y V N K F Q I T K G G A K T
481 tatcaagcgc ggatgat aaacggggt aga atggcacgat tcttctgaggatcagtgcc gg
Y  Q A R M I N G V E W H D S S E D Q C R
541 atactgtgga aggaaa tgaaaatc ttc agataccgcaggatccttcagagtcacca tc
I  L W K G N G K S S D T A G S F R V T I
601 aggggtgctttgc aaaa cccaatag 627
R  V A L Q N P K *
    
```

图 3 马铃薯卷叶病毒 CP 基因序列

atg(M)、tag(\*) 分别代表起始密码子和终止密码子

Fig.3 Sequence of PLRV CP

## 2.4 同源性分析及进化树构建

利用测定的陕西 PLRV 分离物 CP 基因序列, 结合 GenBank 中已报道的 PLRV 分离物 CP 序列, 通过 DNAMAN 软件, 比较它们之间 CP 基因的核苷酸序列同源性, 结果见表 1。由表 1 可见, 与其他已报道的 27 个国内外 PLRV 分离物 CP 基因序列

相比, 陕西 PLRV 分离物与国内多个 PLRV 分离物核苷酸序列同源性达到 99% 以上, 与 PLRV 内蒙古分离物(登录号: FJ859025、FJ859026)同源性达到 100%, 说明陕西马铃薯感染的 PLRV 与内蒙古的 PLRV 为同一株系, 也未发生变异。

表 1 PLRV 陕西分离物与其他已报道的 PLRV 分离物 CP 基因核苷酸序列同源性的比较

Table 1 Homology of CP gene sequence between PLRV Shaanxi isolate and other isolates

序列号 Sequence number	同源性/% Homology	序列号 Sequence number	同源性/% Homology	序列号 Sequence number	同源性/% Homology	序列号 Sequence number	同源性/% Homology
AF022782	96.97	FJ853190	99.68	FJ859017	99.52	FJ859024	99.52
AY079210	97.45	FJ853191	99.36	FJ859018	98.72	FJ859025	100.0
DQ309064	99.52	FJ853192	98.88	FJ859019	99.84	FJ859026	100.0
EF063711	99.36	FJ853193	99.04	FJ859020	99.20	FJ859027	98.88
EU073861	96.98	FJ859014	99.36	FJ859021	99.20	GQ376029	95.37
EU073862	96.50	FJ859015	98.88	FJ859022	99.84	NC001747	98.72
FJ853189	98.88	FJ859016	99.84	FJ859023	99.84		

按上述方法, 通过 DNAMAN 软件, 依据 PLRV · CP 核苷酸序列、氨基酸序列分别构建了 PLRV 的系统进化树, 结果见图 4、图 5。由图 4、图

5 可见, 陕西 PLRV 与内蒙古 PLRV 同为 1 个母系起源, 不是独立的支系。进化树分析与同源性分析结果一致。

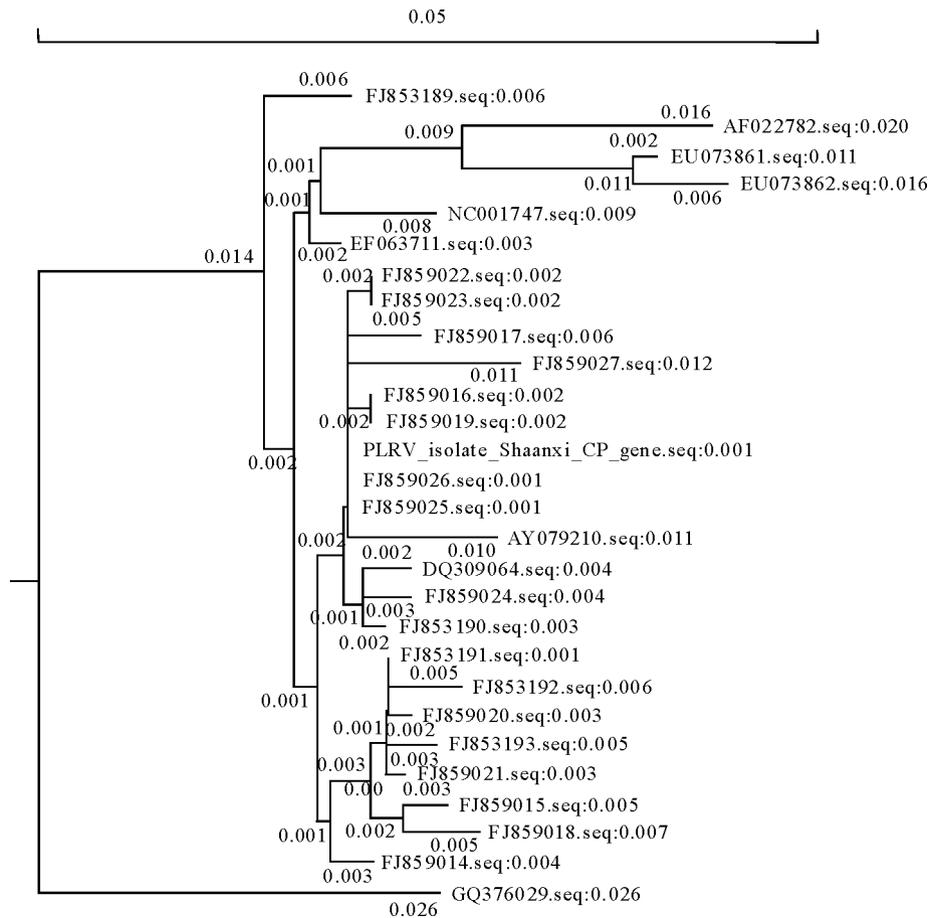


图 4 依据 PLRV · CP 核苷酸序列建立的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PLRV based on the nucleotide sequence of coat protein

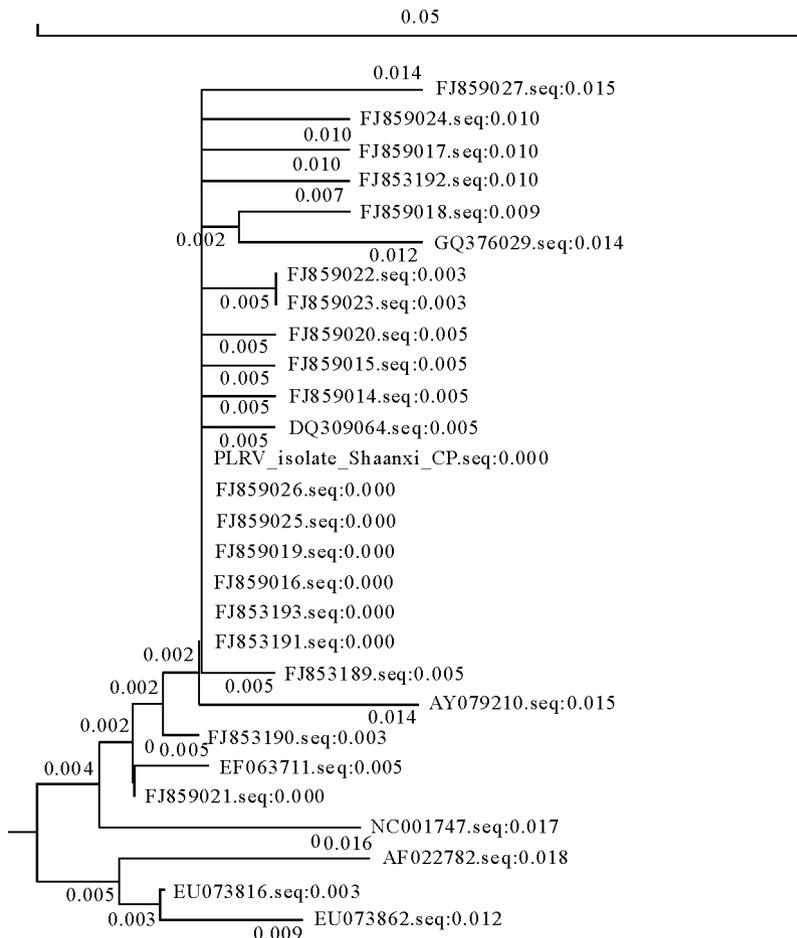


图 5 依据 PLRV · CP 氨基酸序列建立的 PLRV 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of PLRV based on the amino acid sequence of coat protein

### 3 讨论

在马铃薯病毒病鉴定中,许多传统的鉴定方法,如目测法、指示植物鉴别法、免疫学检测法等存在准确度不足、耗时费力或假阳性等问题。目前,采用分子生物学方法对病毒基因组序列结构进行分析鉴定被认为是最为可靠的病毒鉴定方法。本研究采用分子生物学方法,对陕西榆林疑似感染 PLRV 的马铃薯植株总 RNA 进行分离提取,并对其 CP 基因进行了克隆与 DNA 序列测定、分析,得到了 627 bp 的目标基因,CP 基因的核苷酸序列、CP 氨基酸序列与已报道的 PLRV 高度同源,在分子水平上证实了陕西存在 PLRV。

本研究检测到 PLRV 的布尔班克植株,是由农业部种子局作为加工冷冻炸薯条新品种引入我国的美国品种。陕西省榆林市农业科学研究所于 2002 年引进该品种,并进行试验、示范工作<sup>[15]</sup>。PLRV 病害是经蚜虫在田间迁飞吸食传播蔓延的病毒病害。陕北作为我国马铃薯种植五大优势产区之一的

“西北鲜食用、加工用和种用马铃薯优势区”,在病虫害防治中应该高度重视 PLRV 的检测预防,一是在播种时应严格选用脱毒种薯,二是在春夏生长季节应特别注重蚜虫的防治。

志谢:本研究得到榆林市农业科学研究所常勇研究员及武科科等研究生的帮助,在此一并致谢。

#### [参考文献]

- [1] Salazar F. Potato viruses and their control [M]. Lima, Peru: International Potato Center, 1996: 1-35.
- [2] 张 彤, 哈斯阿古拉, 张鹤龄, 等. 用逆转录-聚合酶链反应检测马铃薯卷叶病毒 [J]. 病毒学报, 1996, 12(4): 385-387.  
Zhang T, Hasi Agula, Zhang H L, et al. Detection of potato leafroll luteovirus by reverse transcription and polymerase chain reaction [J]. Chinese Journal of Virology, 1996, 12(4): 385-387. (in Chinese)
- [3] 张 磊, 董家红, 张仲凯. 马铃薯卷叶病毒 RT-PCR-RFLP 的检测分析 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 43-46.  
Zhang L, Dong J H, Zhang Z K. Using RT-PCR-RFLP to detect and analysis potato leafroll virus [J]. Journal of Yunnan University: Nat Sci Ed, 2008, 30(S1): 43-46. (in Chinese)

- [4] 丁 铭,方 琦,李婷婷,等. 马铃薯卷叶病毒云南分离物外壳蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 植物病理学报,2006,36(5): 473-476.  
Ding M, Fang Q, Li T T, et al. Cloning and sequencing of coat protein gene encoding potato leafroll virus Yunnan isolate [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(5): 473-476. (in Chinese)
- [5] 吴兴泉,谭晓荣,陈士华,等. 马铃薯卷叶病毒福建分离物的基因克隆与序列分析 [J]. 河南农业大学学报,2006,40(4): 391-393.  
Wu X Q, Tan X R, Chen S H, et al. Cloning and sequence analysis of CP gene of potato leafroll virus Fujian isolate [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2006, 40(4): 391-393. (in Chinese)
- [6] 周 云,杨永智,王 舰. 青海省马铃薯卷叶病毒的 RT-PCR 法检测 [J]. 西北农业学报,2007,16(6):210-211,224.  
Zhou Y, Yang Y Z, Wang J. Detection of potato leafroll virus by RT-PCR amplification in Qinghai Province [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(6): 210-211, 224. (in Chinese)
- [7] 路 平,王 蒂,司怀军. 马铃薯卷叶病毒的 RT-PCR 的快速检测 [J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(4):532-534.  
Lu P, Wang D, Si H J. A rapid method for detecting potato leafroll virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(4): 532-534. (in Chinese)
- [8] 郑世玲,刘作易. 马铃薯卷叶病毒(PLRV)检测及系统进化关系的研究进展 [J]. 种子,2007,26(2):49-51.  
Zheng S L, Liu Z Y. Advances in researching on potato leafroll virus (PLRV) detection and phylogenetic relationships [J]. Seed, 2007, 26(2): 49-51. (in Chinese)
- [9] 周国辉,李梅辉,许东林,等. 马铃薯卷叶病毒分子鉴定及一步 RT-PCR 检测 [J]. 植物保护学报,2004,31(3):329-330.  
Zhou G H, Li M H, Xu D L, et al. Molecular identification and detection of potato leafroll by RT-PCR [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2004, 31(3): 329-330. (in Chinese)
- [10] 吴志明,朱水芳,张成良,等. 应用 RT-PCR 法快速检测马铃薯卷叶病毒 [J]. 河北农业大学学报,2000,23(4):77-79.  
Wu Z M, Zhu S F, Zhang C L, et al. A rapid method for detection of potato leafroll virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2000, 23(4): 77-79. (in Chinese)
- [11] 魏延安. 陕西省马铃薯产业化发展战略研究 [J]. 干旱地区农业研究,2006,24(6):199-203.  
Wei Y A. Study on potato industrial ization development strategy in Shaanxi [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2006, 24(6): 199-203. (in Chinese)
- [12] 李晓韬,常 勇. 陕北地区脱毒种薯生产中存在的问题及对策 [J]. 榆林学院学报,2006,16(6):8-9.  
Li X T, Chang Y. Existing problem and remedy of detoxication potato seed production in north of Shaanxi Province [J]. Journal of Yulin College, 2006, 16(6): 8-9. (in Chinese)
- [13] 艾 炜. 陕北地区马铃薯生产中的问题及发展对策 [J]. 中国马铃薯,2004,18(5):315-316.  
Ai W. Existing problem and development measure of potato production in north of Shaanxi Province [J]. Chinese Potato Journal, 2004, 18(5): 315-316. (in Chinese)
- [14] 于 翠. 番茄花叶病毒(ToMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)单克隆抗体制备及 ToMV 在烟草上致病分子机理研究 [D]. 浙江杭州:浙江大学,2004:45.  
Yu C. Preparation of monoclonal antibodies of tomato mosaic virus and tobacco mosaic virus and molecular mechanism of pathogenicity of ToMV in tobacco [D]. Hangzhou, Zhejiang: Zhejiang University, 2004: 45. (in Chinese)
- [15] 方玉川,白银兵,李增伟,等. 布尔班克马铃薯高产栽培技术 [J]. 中国马铃薯,2009,23(3):182-183.  
Fang Y C, Bai Y B, Li Z W, et al. High-yield culture technique of Burbank [J]. Chinese Potato Journal, 2009, 23(3): 182-183. (in Chinese)