

人参果主要病毒检测方法研究

裴怀弟¹, 宿兵兵^{1,2}, 李玉斌³, 李淑洁¹, 王立光¹, 李琦¹, 刘新星¹

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 兰州交通大学环境与市政工程学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省农业科学院林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了给人参果病毒检验及抗病性研究提供支持, 对人参果采用 ELISA 和 RT-PCR 两种检测方法对 8 份田间材料中的马铃薯 M 病毒(PVM)、番茄花叶病毒(ToMV)和烟草花叶病毒(TMV)进行检测, 对比筛选病毒检测方法。结果表明, ELISA 法检测 PVM 的阳性检出率为 87.5%; ToMV 为 37.5%, 疑似率为 12.5%; TMV 为 37.5%。通过 RT-PCR 检测体系, 从人参果样品中分别扩增出与试验设计大小相符的特异条带, PVM 阳性检出率为 100%, ToMV 为 50.0%, TMV 为 37.5%, 检测灵敏性和准确性更高, 检测结果符合率在 87.5% 以上。对扩增阳性产物进行凝胶回收测序, 确定为目标条带。

关键词: 人参果; 病毒; ELISA 检测; RT-PCR 检测

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)04-0365-04

[doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2023.04.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.2097-2172.2023.04.016)

Study on the Detection Methods for Main Viruses of Ginseng Fruit

PEI Huaidi¹, SU Bingbin^{1,2}, LI Yubin³, LI Shujie¹, WANG Liguang¹, LI Qi¹, LIU Xinxing¹

(1. Biotechnology Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Institute of Fruit and Floriculture Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: To provide references for virus testing and disease resistance research in ginseng fruit (*Solanum muricatum* Aiton), 8 materials of ginseng fruit were tested from the fields by using ELISA and RT-PCR methods to detect potato virus M (PVM), tomato mosaic virus (ToMV) and tobacco mosaic virus (TMV), and comparison and screening of virus detection methods were conducted. The results showed that by using the ELISA method, the positive detection rates of PVM and ToMV were 87.5% and 37.5%, respectively, suspicion rate was 12.5%, and the positive rate of TVM was 37.5%. By using the RT-PCR detection system, specific bands were amplified from ginseng fruit samples which were consistent with the size of the test design, the positive detection rates of PVM, ToMV and TMV were 100%, 50.0% and 37.5%, respectively, which indicated better detection sensitivity and accuracy, the coincident rate of the detected results was more than 87.5%. The amplified positive product was sequenced by gel recovery and was identified as the target band.

Key words: *Solanum muricatum* Aiton; Virus; ELISA test; RT-PCR test

人参果(*Solanum muricatum* Ait.)又名香瓜茄、长寿果、凤果等, 为茄科茄属多年生草本植物, 原产于南美洲安第斯山脉北麓^[1-2], 自 20 世纪 80 年代引入中国, 在我国多地均有种植。生产过程中人参果通常采用扦插繁殖育苗, 长期无性繁殖造成人参果病毒病的感染和蔓延, 主要表现为植株矮化、节间变短、叶片皱缩呈黄绿相嵌的斑驳状、果实僵化畸形等, 对作物产量及品质影响巨

大。培育无病毒种苗是预防病毒病的有效措施, 同时对病毒的防控、无毒苗生产及海关检疫等方面显得尤为必要^[3]。目前, 关于人参果的研究主要集中在组培快繁^[4-7]、温室栽培及基因组学等方面^[8-13], 而关于病毒的种类、鉴定及高效检测研究相对较少。我们采用双抗体夹心 ELISA 和 RT-PCR 两种检测方法, 对人参果植株主要病毒进行分析, 以期为人参果病毒检验及抗病性研究提

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 甘肃省农业科学院重点研发计划(2020GAAS13); 甘肃省科协2020年学会助力精准扶贫项目(GXH20200820-1); 甘肃省农业科学院成果转化项目(2021GAAS-CGZH05); 兰州市科技计划项目(2019-1-67)。

作者简介: 裴怀弟(1979—), 女, 甘肃天水人, 副研究员, 主要从事作物种苗快繁与栽培技术研究工作。Email: phdfeixi-ang@163.com。

供支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为人参果组培苗, 共 8 份, 培养材料为人参果侧芽, 采自甘肃省武威市民勤县双茨科镇农户温室大棚, 由甘肃省农业科学院生物技术研究所在培育并提供, 实验所用试剂均为化学分析纯。

1.2 试验方法

将大田采集的人参果侧芽用流水冲洗 3~4 h, 控干水分, 在超净工作台上用无菌水洗 3~5 遍, 用 70%乙醇消毒 30~40 s, 投入 1 g/kg 升汞溶液中消毒 5~6 min, 再用无菌水洗 5~6 次, 置于垫有滤纸的培养皿中晾干水分后接种于 MS 培养基(添加 30 g/L 蔗糖)中, pH 为 5.8~6.0。在温度(25±2)℃、光照 12~16 h, 光照强度 2 000~3 000 lx 条件下培养, 每隔 25 d 左右进行转接, 获得无菌苗备用。

1.2.1 引物的设计 根据 GenBank 数据库上已公布的 PVM、TMV、ToMV 的 RNA 序列, 对 PVM (NC_001361.2)、ToMV (NC_002692.1) 和 TMV (NC_001367.1) 序列进行 BLAST (basic local alignment search tool) 相似性比较, 找出 3 种病毒 RNA 的高度特异性区域, 设计试验所用引物。所用引物均由上海生工生物技术有限公司设计、合成, 引物序列信息见表 1。

1.2.2 RNA 提取 采用 TIAN GEN RNAprep pure Plant Kit (DP432) 提取人参果叶片总 RNA。取 50~100 mg 植物叶片, 在液氮中迅速研磨成粉, 加入 450 μL 裂解液 RL, 旋涡剧烈震荡混匀。其他步骤按说明书操作。将提取的总 RNA 溶解于 50 μL 的 ddH₂O 中备用。

1.2.3 RT-PCR 检测 采用 TIAN GEN FastKing-gDNA Dispelling RT SuperMix 反转录试剂盒 (KR118-02), 以总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, 然后在 MiniAmp Thermal Cycler 仪上进行 PCR 扩增。扩增体系为将 cDNA 1 μL 加入 14 μL-

RT-PCR 反应液中, 混匀后放入仪器中进行扩增。扩增条件为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 RT-PCR 产物回收与测序 取扩增产物 25 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 各条带充分分离时切取胶进行纯化。PCR 产物纯化步骤按 TIANgel Purification Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作说明进行, 回收产物由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 双抗体夹心 ELISA 检测 取 0.2 g 人参果叶片置于研钵中, 加 1.5 mL 提取缓冲液, 研磨成匀浆后转移到 2 mL 离心管中, 摇匀; 4℃、12 000 r/min 下离心 5 min, 将上清液转移到干净的离心管中, 置 -20℃ 保存备用。ELISA 检测所用试剂盒购自 Agdia 公司(产品编号: PSA60000), 测定方法按抗体说明书进行。在试验条件恒定的情况下, 利用标本 / 阴性对照的比值进行分析。根据测定所得的吸光度求出被测样品光密度值(P)与标样(健康材料)光密度值(N)比值(P/N)。结果判定: P/N < 1.50 者, 为阴性(不带毒材料); P/N 介于 1.50~1.99 者, 为疑似(轻度带毒材料); P/N ≥ 2.00 者, 为阳性(带毒材料)。

2 结果与分析

2.1 ELISA 检测

利用双抗体夹心 ELISA 对人参果主要病毒进行检测, 结果(表 2)表明, 人参果中含有马铃薯 M 病毒(PVM)、番茄花叶病毒(ToMV)和烟草花叶病毒(TMV)病毒。检测数据显示, PVM 的阳性检出率为 87.5%; ToMV 的阳性检出率为 37.5%, 疑似率为 12.5%; TMV 的阳性检出率为 37.5%。上述结果表明, 田间种植的人参果中普遍含有马铃薯 M 病毒, 为最主要病毒, 其次为番茄花叶病毒和烟草花叶病毒。

2.2 RT-PCR 检测

以人参果总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增

表 1 RT-PCR 引物序列

病毒	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物大小 /bp
PVM	GGGGTGTGCGCTTGCTCTAGTTG	CGCACAGGCTCTACAGTTAGGC	261
ToMV	TGGGTATGTTTGCTTAGTCGGTCTTG	GTCCTCCATCGTTCACACTCGTTAC	365
TMV	AAGGTTGTCTTGTGGACGGAGTTC	TGATGTATGGAATCTGCTGTGTCTC	343

表 2 双抗体夹心 ELISA 检测结果

样品编号	TMV			ToMV			PVM		
	OD405 nm	P/N	反应 ^①	OD405 nm	P/N	反应 ^①	OD405 nm	P/N	反应 ^①
N	0.182	1.000	-	0.117	1.000	-	0.099	1.000	-
P	3.930	21.593	+	3.532	30.188	+	1.061	10.717	+
C4	0.227	1.247	-	0.166	1.419	-	0.389	3.929	+
C5	0.184	1.011	-	0.141	1.205	-	0.429	4.333	+
R3	0.183	1.005	-	0.174	1.487	-	0.134	1.354	-
Y11	3.726	20.473	+	3.727	31.855	+	0.303	3.061	+
L81	3.878	21.308	+	4.180	35.726	+	0.308	3.111	+
L82	3.902	21.440	+	3.903	33.359	+	0.381	3.848	+
ZH2	0.233	1.280	-	0.127	1.085	-	0.611	6.172	+
YN-5	0.175	0.962	-	0.176	1.504	+/-	0.344	3.475	+

①“-”表示不带毒, “+/-”表示带毒较轻, “+”表示带毒。

后, 3 种病毒的感病植株在琼脂糖凝胶上分别呈现出与目标片段大小相一致的反应谱带。如图 1 所示, 扩增后得到了分子量分别为 261 bp(PVM)、365 bp(ToMV)、343 bp(TMV)的片段, 且该片段与理论设计长度相一致。测定结果表明, PVM 的阳性检出率为 100%。ToMV 的阳性检出率为 50.0%, TMV 的阳性检出率为 37.5%。

2.3 基因序列同源性比对

随机抽取人参果 3 种病毒 cDNA 扩增检测为阳性的样本各 3 份进行凝胶回收纯化, 对回收产物进行测序(图 2)。测序结果经与 NCBI 报道的 3 种病毒的基因序列相比同源性很高, 阳性标本基因序列比对结果: PVM 同源性为 94.25%, ToMV 为 100%, TMV 为 81.34%, 说明 3 种病毒引物在

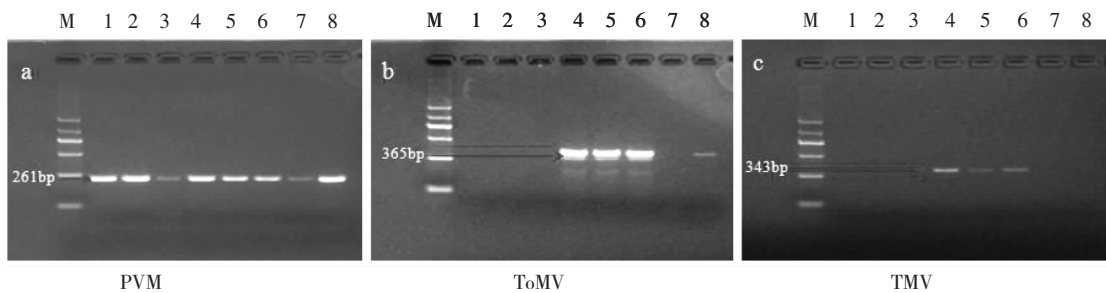


图 1 RT-PCR 检测结果

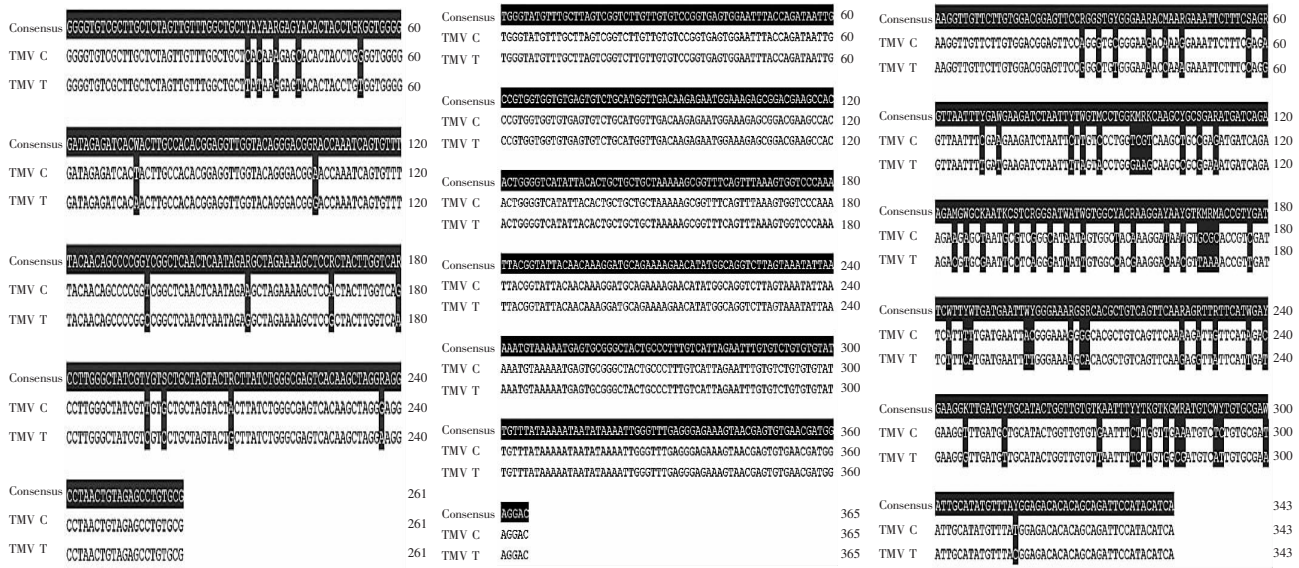


图 2 基因序列比对结果

人参果中所提取的 RNA 中扩增出的基因片段为 PVM、ToMV 和 TMV 的目标片段。

2.4 两种检测方法对比

对 8 份人参果材料用两种方法检测的结果进行比较, 结果(表 3)表明, 2 种检测方法有较高的符合率, RT-PCR 检测效率和准确性更高, ELISA 检测为疑似的植株通过 RT-PCR 检测则为阳性, 避免了假阴性的出现, 检测灵敏性更高。二者检测符合率在 87.5% 以上。

表 3 RT-PCR 与双抗体夹心 ELISA 检测对比结果

病毒	检测植株数 /株	带病植株数/株		符合率 %
		双抗体夹心 ELISA	RT-PCR	
PVM	8	7	8	87.5
ToMV	8	4	4	100
TMV	8	3	3	100

3 讨论与结论

植物病毒检测常用的方法中有生物学、电子显微观察法、血清学和分子生物学等^[14-15], 实际操作中多采用两种以上方法相结合来判断检测结果的准确性。酶联免疫吸附法(ELISA)测定方便、灵敏度较高, 但只能检测到纳克水平的病毒, 难于检测更低浓度的病毒^[16]; 聚合酶链反应技术(PCR)是分子生物学中最常见的检测方法之一, 通过体外扩增的方法对供试样品中的目的基因片段进行扩增, 从而对即使病毒含量极低的样品也能灵敏准确地得到定性的检测结果, 其灵敏度和特异性较高, 是一种较好的植物病毒检测方法^[17]。

本试验采用两种方法检测的结果表明, 田间种植的人参果普遍含有马铃薯 M 病毒, 为最主要的病毒, 其次为番茄花叶病毒和烟草花叶病毒。ELISA 检测中 PVM 的阳性检出率为 87.5%; ToMV 为 37.5%, 疑似率为 12.5%; TMV 为 37.5%。试验建立的 RT-PCR 检测体系, 从人参果样品中分别扩增出与试验设计大小相符的特异条带, 结果显示, PVM 阳性检出率为 100%, ToMV 为 50.0%, TMV 为 37.5%, 这在基因水平上为马铃薯 M 病毒、番茄花叶病毒和烟草花叶病毒的检测提供了更快速、灵敏检测手段, 避免了假阴性的出现, 且检测结果符合率在 87.5% 以上。

参考文献:

[1] 王福国, 黄少学. 高海拔冷凉地区日光温室人参果栽

培技术[J]. 农业科技与信息, 2008(15): 23-24.

- [2] 王泽东, 雷成军, 万柔旦才让. 高寒山区日光温室人参果组培苗驯化扩繁技术[J]. 甘肃农业科技, 2020(7): 92-94.
- [3] 袁志豪, 李振峰, 陆月霞, 等. 百合病毒的高通量测序鉴定和 RT-PCR 检测[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(3): 157-163.
- [4] 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 等. 人参果的脱毒与快速繁殖[J]. 中国农学通报, 2001, 17(2): 4-7.
- [5] 刘兴成, 王文庆. 人参果组培快繁培养基的筛选研究[J]. 甘肃农业科技, 2009(10): 17-19.
- [6] 张俊伟, 郭盘江, 陈冠吉. 人参果组织培养技术研究[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(2): 21-22.
- [7] 张菲菲, 张金文, 石菁. 人参果茎尖分生组织试管苗再生体系的建立与优化[J]. 草原与草坪, 2013, 33(4): 34-38.
- [8] 刘开琳, 刘虎俊, 刘淑娟, 等. 干旱区日光温室人参果栽培技术——以民勤县双茨科镇日光温室为例[J]. 农业科技与信息, 2020, 20(601): 93-95.
- [9] 刘建光. 沙漠地区日光温室人参果栽培技术研究[J]. 农业技术与装备, 2021(5): 163-164.
- [10] 陈姝欣, 朱浩东, 杨梦思, 等. 基于人参果转录组测序的 SSR 和 SNP 特征分析[J]. 西南农业学报, 2020, 33(11): 2412-2416.
- [11] 高宜峰, 张菲菲, 张金文, 等. TMV、PVM 和 CMV 干扰载体构建及对人参果遗传转化[J]. 核农学报, 2014, 28(1): 44-51.
- [12] 郑红英, 陈炯, 陈剑平. 侵染人参果的马铃薯 M 病毒基因组全序列分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(3): 336-341.
- [13] 王克婧, 张金文, 张菲菲, 等. 重组 *des-pGlu1-Brazzein* 基因植物表达载体的构建及对人参果的遗传转化[J]. 分子植物育种, 2016, 14(6): 1470-1481.
- [14] 蒋康, 罗俊杰, 王红梅, 等. 人参果种苗脱毒与病毒检测技术研究进展[J]. 农业工程, 2020, 10(11): 102-106.
- [15] 迟惠荣, 毛碧增. 植物病毒检测及脱毒方法的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 26-33.
- [16] XU P S, NIIMI Y. Evaluation of virus-free bulb production by antiviral and/or heat treatment in vitro scale cultures of *Lilium longiflorum* Georgia and L. Casablanca[J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1999(68): 640-647.
- [17] 马筠. 植物病毒鉴定检测方法的研究进展[J]. 世界农业, 2003, 25(8): 50-51.