

RT-PCR 技术快速检测烟草丛顶病研究*

RT-PCR Detection of Tobacco Bushy Top Disease

莫笑晗¹, 秦西云¹, 陈海如²

(1. 云南烟草研究院生物技术重点实验室, 农业研究所, 云南 昆明 650106;

2. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

中图分类号: S 435.72

文章编号: 1004-390X(2002)04-0444-01

烟草丛顶病(tobacco bushy top disease)是近年来在我国云南省西部的保山、大理、楚雄等烟区爆发流行的一种毁灭性烟草病害。截至 2001 年, 云南省累计发病面积达 4 万 hm^2 , 平均发病率约为 15%, 造成了上亿元的经济损失。该病的病原物研究长期处于争论状态, 被暂时命名为“云南烟草丛枝病(tobacco witches' broom disease)”, 植原体学说、新的病毒病学说等都曾经长期占据人们的视野。Mo 等明确了该病是由烟草丛顶病毒(Tobacco bushy top virus, TBTv)和烟草脉扭病毒(Tobacco vein distorting virus, TVDV)引起的烟草丛顶病。

烟草丛顶病是以蚜虫为主要传播途径, 建立快速、灵敏、高通量的检测方法, 对及时淘汰病苗, 检测带毒介体昆虫和带毒中间寄主, 从而指导丛顶病防治有重要的意义。RT-PCR 是 90 年代发展起来的一种快速、灵敏检测植物 RNA 病毒的方法, 具有检测灵敏度高、快速等优点。本研究应用该方法对烟草丛顶病进行快速鉴定。

1 引物的设计

根据烟草丛顶病毒的复制酶基因的部分序列(GenBank AF402620), 设计了寡核苷酸引物 TBTv5' 和 TBTv3', 其扩增长度为 450 bp; 根据烟草脉扭病毒的外壳蛋白基因的部分序列(莫笑晗等, 未发表资料)设计了寡核苷酸引物 TVDV5' 和 TVDV3', 其扩增长度为 350 bp; 根据烟草丛顶病毒相关的 RNA

(Sat-like RNA)的部分序列(莫笑晗等, 未发表资料)设计了寡核苷酸引物 TBS4 和 TBS3, 其扩增长度为 600 bp.

2 RT-PCR 检测烟草丛顶病

以 Access one-tube RT-PCR system (Promega) 一步法检测烟草丛顶病的病原物, 包括 TBTv, TVDV 以及 Sat-like RNA, 反应参见说明书。反应条件如下: 48 $^{\circ}\text{C}$ 下 45 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min(后延伸)。反应产物以 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 溴化乙锭染色, VDS 成像系统拍照。

3 结果和讨论

RT-PCR 的结果显示上述 3 对引物均可特异灵敏的检测烟草丛顶病, 病烟和带毒蚜虫中均可扩增出特异的产物, 长度与引物设计相同, 健康烟株则无扩增产物, 说明我们的引物可以有效地检测烟草丛顶病。长期以来对烟草丛顶病的诊断主要依据症状学特征和与烟草丛顶病相关的 RNA。我们建立的 RT-PCR 的方法是在对烟草丛顶病病原物进行深入研究的基础上, 根据病原物本身的遗传物质的核酸序列设计引物, 具有快速、灵敏、准确、高通量的优点, 对烟草丛顶病的早期检测, 测定田间带毒率、研究烟草丛顶病的传毒昆虫有重要的意义, 必将在烟草丛顶病的防治中发挥重要的作用。

* 收稿日期: 2002-05-08

基金项目: 云南省烟草公司科技计划(9424)

作者简介: 莫笑晗(1973-), 男, 河南人, 助理研究员, 主要从事植物病毒学研究。