

番木瓜抗病突变体阻碍环斑病毒体内运转*

周国辉, 李华平, 张曙光, 范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室, 广东广州 510642)

Block of Viral Movement in Papaya Mutant Plants Resistant to Papaya Ringspot Virus

ZHOU Guo-hui LI Hua-ping ZHANG Shu-guang FAN Hwai-zhong

(Plant virology laboratory, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: One-step RT-PCR was used to detect papaya ringspot virus (PRSV) movement in susceptible and resistant (mutant) papaya (*Carica papaya* L.) plants. The time of post-inoculation at which PRSV was first detected in susceptible plants was 48 hours in the other area of inoculated leaves out of inoculated sites, 4 days in the petioles of inoculated leaf and 6 days in all parts of plant. Comparatively, in resistant plants, the inoculated sites were the only area at which PRSV can be detected any time. Therefore, it was proposed that the mutated resistance to PRSV protects the virus from moving out of inoculated sites or/and into non-inoculated areas.

Key Words: Papaya ringspot virus; RT-PCR; Viral movement; Resistant mutant

摘要: 应用 RT-PCR 一步法检测了 PRSV Ys 株系在感病番木瓜及其抗病突变体植株体内的运转动态, 结果表明: 在感病植株中, 接种后 48hr 接种叶的未接种部位可检出病毒, 第 4 天部分接种叶柄可检出病毒, 第 6 天植株各部位均能检出病毒; 而在抗病植株中, 接种后可以而且仅能在接种部位检出病毒; 因而认为抗病突变体能够阻碍病毒从接种部位运出及(或)向未接种部位运入。

关键词: 番木瓜环斑病毒; 反转录 PCR; 病毒运转; 抗病突变体

中图分类号: S436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0055-04

植物对病毒的抗性表现之一为抗病毒的体内运转^[1]。我们采用辐射诱变技术筛选到番木瓜抗环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV)的突变体, 初步试验显示, 该突变体可能阻碍了病毒在植株体内的运转。运用高灵敏度的方法检测病毒的运转情况, 是研究抗病机理的基础之一。为此, 我们采用微量 RT-PCR 一步法, 对 PRSV 在番木瓜感病品种及抗病突变体植株体内的运转动态进行了检测。本文报道该研究结果。

1 材料与方

1.1 供试材料

1.1.1 番木瓜抗病突变体 1992 年, 采用⁶⁰Co γ -

射线处理番木瓜“园优一号”(F1 代, 泰国木瓜 穗中红)干种子, 共处理 30 000 颗种子, 播种成苗 8 000 多株, 幼苗经 2 次病叶汁液摩擦接种 PRSV Ys 株系, 不显症或显症轻微者定植于室外, 最终筛选得一株表现高度耐病(症状一直很轻微)的植株, 经组培扩繁、回交、自交, 获得突变第三代(M₃, the third mutated generation)(结果待发表), M₃ 幼苗经 PRSV Ys 株系病叶汁液摩擦接种, 20 天仍不显症者, 去除基部接种叶, 供本试验用, 称为抗病突变体植株。

1.1.2 番木瓜感病植株及 PRSV 非寄主植物 番木瓜感病品种“穗中红 48”(种子购自广州市果树研

收稿日期: 1999-12-30, 修回日期: 2000-04-29

* 基金项目: 广东省重点科技项目(99M04202G)资助。

作者简介: 周国辉(1963-), 男, 安徽太湖籍, 博士, 主要从事植物病理学(植物病毒学)教学和科研工作。

究所)及心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)(PRSV非寄主植物)7~8叶期幼苗。

1.1.3 供试毒源 PRSV Ys株系(本研究室分离、鉴定和保存)^[7]。

1.1.4 试剂 RT-PCR一步法样品处理试剂盒及酶混合物购自华美生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒接种 生长于防虫网室内的供试植物,摘除基部2~3张老叶,病叶汁液摩擦接种上部3张平展叶的顶部小叶^[7],清水冲洗接种部位(小心不使病叶汁液污染供试植株的其他部位),置于高湿环境下培养,以避免接种部位发生干枯。

1.2.2 采样及植物总RNA的抽提 接种病毒后不同时间,用经酒精灯火焰充分烧灼过的解剖刀,切取一定面积的待检叶片或一定长度的待检叶柄、茎段或根段,置于干热灭菌后的凹玻片上,参照RNA样品处理试剂盒说明,抽提植物总RNA,具体步骤为:向样品滴加约150 μL 变性液,用经酒精灯火焰充分烧灼的玻璃棒研碎样品,吸取汁液置于1.5 mL离心管中,加250 μL 氯仿:异戊醇(24:1),充分振荡,12000 r/min离心10 min,取上清液,加等体积异丙醇,混匀,12000 r/min离心10 min,沉淀用75%乙醇洗一次,吹干,溶于20 μL 无RNase的 H_2O 中,即为RNA抽提液。

1.2.3 RT-PCR及其产物电泳检查 采用叶长明等^[8]设计的一对PRSV CP基因引物,即上游引物(P_1)为:5'-TTAGTTGCGCATACCCAGG-3',下游引物(P_2)为:5'-ATGTCCAAGAATGAAGCTGTG-GAT-3';设计扩增产物为860 bp。反应体系参照试剂盒说明,采用10 μL 反应体积,内含RNA抽提液1 μL ,20 \times buffer 0.5 μL ,25 mmol/L MgCl_2 1 μL ,10 mmol/L dNTP 0.1 μL ,酶混合液 0.7 μL ,引物 P_1 、 P_2 各0.1 $\mu\text{mol/L}$,补双蒸水至10 μL ,反应液上覆盖石蜡油15 μL ,置Biometra公司UNO II热循环仪上按下述程序进行反应:37 $^\circ\text{C}$ 反转录45 min;94 $^\circ\text{C}$,1 min;55 $^\circ\text{C}$,1 min;72 $^\circ\text{C}$,1.5 min;35个循环后,72 $^\circ\text{C}$ 延伸10 min。反应产物在含EB的1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳,紫外灯下观察并照相,根据分子量标准判断是否发生了PRSV CP基因的扩增。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR一步法检测PRSV的灵敏度

取接种15 d后“穗中红48”现症叶片50 mg,抽

提总RNA,抽提液用无RNase污染的双蒸水进行10倍系列稀释,RT-PCR一步法扩增,电泳结果(图1)表明:(1)RNA抽提液在稀释 10^{-5} 后仍能扩增出860 bp的特异条带,即RT-PCR一步法能够检出相当于25 ng病叶中的病毒;(2)RT-PCR一步法检测PRSV时,应采用合适的模板(样品)浓度;本例中以稀释度为 10^{-2} ~ 10^{-4} 的RNA抽提液为佳,随着模板浓度的升高,目的片段扩增量增加,但浓度过高(稀释度为 10^0)时,目的片段量反而减少,并且出现严重的拖尾现象;其原因可能如下:反应体系中RNA模板量过多,在进行反转录时形成了过多的反转录产物,在其后的PCR中,这些反转录产物又能自身回折合成双链,它们大小不一,因而在电泳时呈拖尾状;同时反转录及其后的双链合成消耗了反应体系中大量的上游引物及dNTPs等底物,进而限制了目的片段的扩增;此外,浓度过高时,植物的干扰物质相应增多,也会影响扩增结果。



图1 RT-PCR一步法检测PRSV的灵敏度

1-6:分别为病叶RNA抽提液稀释度为 10^{-3} ~ 10^0 的RT-PCR扩增产物,M:DNA分子量标准(100 bp ladder)

Fig 1 Detection of PRSV in various RNA extract dilutions by one-step RT-PCR

1-6:RT-PCR products from 10^{-3} - 10^0 dilutions of RNA extract. M:DNA molecular marker(100bp ladder)

2.2 RT-PCR一步法样品量的确定

以接种病毒后15 d的病株为研究对象,取不同面积的叶片或不同长度的根、茎、叶柄进行RT-PCR一步法检测,最终确定最佳样品量为:叶片面积约 1 cm^2 ,根、茎、叶柄长度约1 cm。电泳结果见图2。

2.3 PRSV Ys株系在供试植株体内的运行动态

应用上述确立的微量RT-PCR一步法,对PRSV



图 2 RT-PCR 一步法检测 PRSV 植株组织最佳样品量
1:叶肉 1cm², 2:主脉 1cm 切段, 3:叶柄 1cm 切段, 4:上部(第一平展叶与第二平展叶之间)茎秆 1cm 切段, 5:基部茎秆 1cm 切段, 6:主根根毛区 1cm 切段, M:分子量标准(100 bp ladder)
Fig. 2 Determination of optimum amount of plant samples by one-step RT-PCR
1: Leaf blade 1cm², 2: Main vein 1cm, 3: Petiole 1cm, 4: Uper stem 1cm, 5: Base stem 1cm, 6: Main root 1cm, M: DNA molecular marker (100 bp ladder)

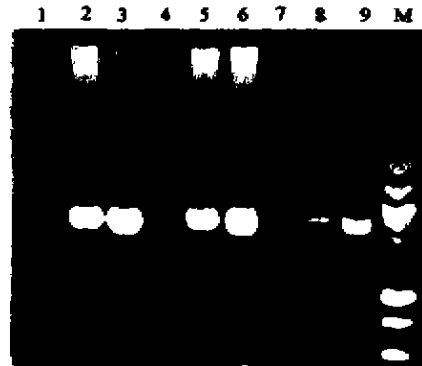


图 3 感病番木瓜接种 48hr 后 RT-PCR 检测结果
1, 4, 7:接种叶的叶柄, 2, 5, 8:接种叶的未接种部位, 3, 6, 9:接种部位的叶肉, M:DNA 分子量标准(100 bp ladder)
Fig. 3 Detection of PRSV in susceptible papaya plants at 48 hr post-inoculation
1, 4, 7: Petioles of inoculated leaf, 2, 5, 8: Uninoculated area in inoculated leaf, 3, 6, 9: Inoculated leaf sites, M: molecular marker(100 bp ladder)

表 1 PRSV Y₅ 在抗感病番木瓜体内运转动态(广州, 1999. 10.)

Table 1 The transport dynamics of PRSV Y₅ in susceptible and resistant papaya plants (Guangzhou, 1999. 10.)

检测部位 Detected position	供试植物 Tested plants	接种后 Time of post-inoculation						
		12 hr	24 hr	48 hr	3 d	4 d	5 d	6 d
接种部位叶肉 (Inoculated sites of leaf blades)	感病番木瓜(susceptible papaya)	+++	+++	+++				
	抗病番木瓜(resistant papaya)	+++	+++	+++				+++
	心叶烟(<i>Nicotiana glutinosa</i>)	+++	—	—				
接种叶未接种部位 (Uninoculated area in inoculated leaf)	感病番木瓜(susceptible papaya)			—	—	+++	+++	
	抗病番木瓜(resistant papaya)	—	—	—				—
	心叶烟(<i>Nicotiana glutinosa</i>)	—	—	—				
接种叶叶柄 (Petioles of inoculated leaf)	感病番木瓜(susceptible papaya)			—	—	+/-	+++	
	抗病番木瓜(resistant papaya)			—				
	心叶烟(<i>Nicotiana glutinosa</i>)			—				
接种叶上部茎秆 (Uper stemes of inoculated leaf)	感病番木瓜(susceptible papaya)						—	+++
根颈部 (Base stemes)	感病番木瓜(susceptible papaya)						—	+++
主根根毛区 (Main roots)	感病番木瓜(susceptible papaya)						—	+++

+ 号表示检测为阳性的植株, — 号表示检测为阴性的植株
+ Indicates the positive plant, — Indicates the negative plant

Y₅ 株系在番木瓜“穗中红 48”、M₃ 抗病突变体以及非寄主植物心叶烟植株体内的运转动态进行了检测, 重复测定 3~4 株, 结果(表 1、图 3、图 4)表明, 在感病植株上, 接种后 48 h 即可于接种叶未接种部位检出病毒, 第 4 天部分植株(1/3)的接种叶柄内存

在病毒, 第 6 天接种植株的各部位均可检出病毒, 症状观察表明, 接种后第 9 天部分植株(9/20)现症, 第 11 天接种的 20 株全部现症。在 M₃ 抗病突变体植株上, 接种后各个时期采样(直至第 10 天)均只能在接种部位检出病毒, 这说明病毒可在接种部位的细

胞内复制,但不能从接种部位运出或(和)不能向未接种部位运入。在非寄主植物心叶烟上,于接种后的12 h在接种部位检出了病毒,而此后在植株各部位均不能检出病毒,表明残留于接种叶的病叶汁液中的病毒,在12 h内可维持稳定,此后即被各种因子降解掉。

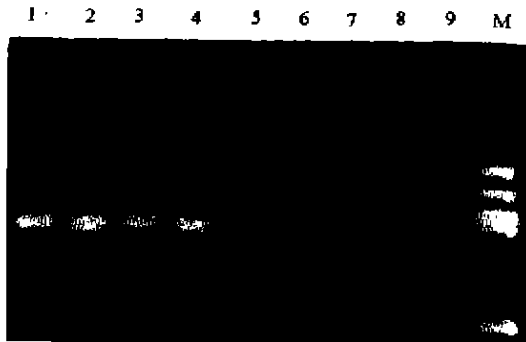


图4 抗病番木瓜接种6天后RT-PCR检测结果

Fig 4 Detection of PRSV in resistant papaya plants at 6 day post-inoculation

1-4:接种部位,5-8:接种叶未接种部位,9:健叶,M:DNA分子量标准(100 bp ladder)

1-4: Inoculated sites, 5-8: Uninoculated area in inoculated leaf, 9: Healthy leaf, M: molecular marker(100 bp ladder)

3 讨论

诱变可使植物发生基因变异,出现新的性状^[9]。我们获得的番木瓜辐射突变体,具有抗PRSV Ys和Vb株系的能力(另文报道),本研究明确了其抗性表现为阻碍病毒在体内运转。

植物阻碍病毒的体内运转可以表现为抗病毒的胞间运转,也可以表现为抗病毒的长距离运转。豇豆对烟草花叶病毒U2株系^[11]、烟草的一个辐射诱变品种对马铃薯Y病毒等^[10]的抗性就是表现为前者(病毒可在接种初侵染细胞内正常复制,但不能向相邻细胞运转);而大豆的一个品种对豇豆褪绿斑驳病毒的抗性则表现为后者^[11](病毒在其接种小叶的叶肉细胞间运转不受限制,但不能进入维管束韧皮部薄壁细胞)。我们获得的番木瓜抗病突变体是抗病毒运转的哪一步骤,还有待深入研究。

研究病毒的体内运转,需要高灵敏度的病毒检测方法。常规的血清学方法需要高效价的抗血清,

而且其灵敏度也往往难以达到要求;cDNA探针技术操作繁琐,耗时过长;RT-PCR(反转录PCR)技术被成功地用于植物RNA病毒的检测^[2,3],该方法特异性强,灵敏度高,所需样品量极少^[4,5],很适合病毒体内运转动态的研究;但是常规RT-PCR需要首先对RNA模板进行反转录,然后再取反转录产物进行PCR,程序较繁,而且需要消耗较多的反转录酶及RNA酶抑制剂等成本较高的试剂,使其应用受到限制;RT-PCR一步法克服了上述不足,在减少操作的同时,还充分地利用了反转录酶,因而也有效地降低了成本^[6]。本研究采用的微量RT-PCR一步法,全部使用国产试剂,成本较低,操作较为简单,可有效地检测病毒在植株体内的运转。

参考文献

- [1] Ponz F, Bruening G. Mechanisms of resistance to plant viruses [J]. *Ann Rev Pathol*, 1986, 24:355 - 381.
- [2] Henson JM, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis[J]. *Ann Rev Pathol*, 1993, 31:81 - 109
- [3] Langeveld SA, Dore JM, Memeln KJ, *et al.* Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers[J]. *J Gen Virology*, 1991, 72:1531 - 1541
- [4] Zhang YP, Uyemoto JK, Golino A, *et al.* Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with Grapevine rippestris stem-pitting disease[J]. *Phytopathology*. 1998, 88:1231 - 1237.
- [5] Routh G, Zhang YP, saldaroli P, *et al.* Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of grapevine leaf roll-associated viruses-4 and 5[J]. *Phytopathology*, 1998, 88:1238 - 1243.
- [6] 张晓光, 阎小君, 苏成芝, 等. 一步反转录PCR法从组织及细胞中扩增HEK5[J]. *中华医学检验杂志*, 1998, 21(4):239
- [7] 蔡建和, 范怀忠. 华南番木瓜病毒种类调查鉴定[J]. *华南农业大学学报*, 1994, 15(4): 13 - 17.
- [8] 叶长明, 叶寅, 骆学海, 等. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(3): 161 - 164.
- [9] Harten AM van. Mutation breeding: theory and practical applications [M]. Cambridge University Press. 1998. 246 - 248
- [10] Dunnington SW, *et al.* Variation in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco[J]. *Virology*, 237:452 - 459.
- [11] Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC. VPg tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement[J]. *J Virol*. 1997, 71:8624 - 8631.