



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116286957 A
(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202310481216.3

(22) 申请日 2023.04.28

(71) 申请人 中国科学院华南植物园
地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号

(72) 发明人 张艺 邓书林 杨选钢 吕善武
刘赛

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限
公司 44001
专利代理师 刘明星 朱聪聪

(51) Int. Cl.
C12N 15/82 (2006.01)

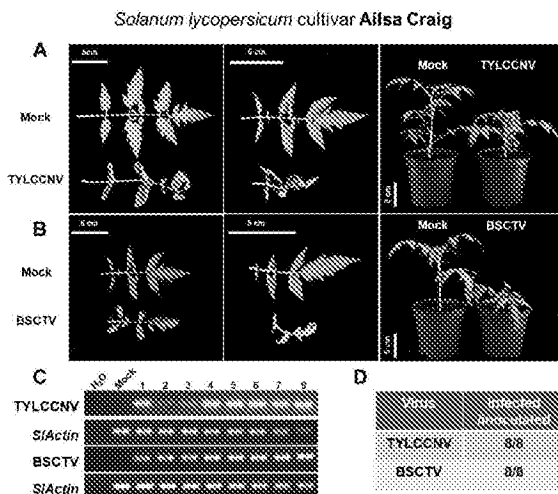
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法

(57) 摘要

本发明公开了一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法。将含有双生病毒感染性克隆的农杆菌,通过浸泡法接种番茄。本发明所提供的方法不仅效率高,成本低,而且操作简易,稳定性好,可以保证每一株番茄苗的接种量一致,并且可以根据需要扩大接种规模,进而实现大规模的接种及筛选,能为后续筛选抗性品种及番茄双生病毒病的研究提供技术上的有力支持。



1. 一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法,其特征在于,将含有双生病毒侵染性克隆的农杆菌,通过浸泡法接种番茄。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,将番茄苗浸泡于含有双生病毒侵染性克隆的农杆菌AGL1菌液3-6小时后,转移到清水中继续浸泡12小时,然后移栽到营养土:蛭石体积比例为3:1混合的基质中继续培养。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,当选用培养基萌发的只有两片真叶的番茄幼苗为材料接种病毒时,用注射器针尖刺伤番茄幼苗的根和下胚轴4-6次,获得农杆菌侵染的伤口,再进行农杆菌浸泡。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,当选用已经长出4片复叶以上的,可用于扦插的番茄苗为材料接种病毒,浸泡前用小刀将番茄苗的茎切出45度的新鲜切面,再进行农杆菌浸泡。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,浸泡番茄苗的菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$ 。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,浸泡番茄苗时的温度为室温25度左右,浸泡时应避光。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,将含有双生病毒侵染性克隆转化进入农杆菌AGL1中,农杆菌单克隆菌落用相应抗性的LB培养基培养后,农杆菌重悬于完全诱导培养基中,培养后,农杆菌再重悬于1/4MS浸泡缓冲液中,获得农杆菌AGL1菌液,用于浸泡接种番茄苗;

20×AB盐

NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
加水	补齐 1 L
高温高压灭菌	

诱导培养基

MES	9.76 g
葡萄糖	5 g
NaH ₂ PO ₄	0.24 g
水	800 mL
用 NaOH 调节 pH 到 5.6	
加水	补齐 1 L
高温高压灭菌	

完全诱导培养基

20×AB盐	50mL
200mM乙酰丁香酮	1mL
相应抗生素	x mL

诱导培养基	补齐1L
-------	------

1/4MS浸泡缓冲液

Murashige and Skoog 培养基粉末	1.1g
蔗糖	10 g
200 mM 乙酰丁香酮	1 mL
Silwet L-77	100 μ L
去离子水	800 mL
用 NaOH 调节 pH 到 6.0	
加去离子水	补齐 1 L

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的双生病毒侵染性克隆是中国番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆pBinPLUS-1.7A和 β 环侵染性克隆pBinPLUS-2 β ;或甜菜严重曲顶病毒侵染性克隆。

一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物病毒学领域,具体涉及一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法。

背景技术

[0002] 番茄是重要的经济作物,但是番茄产业却受到病虫害的严重威胁,其中,番茄病毒病近些年来日益严重。番茄双生病毒病,又称为曲叶病或卷叶病,发病的叶片发黄、变小,边缘上卷。发病集中在新生叶片和顶芽,通常下部叶片正常,因此又叫曲顶病,生产上常被叫做“龙头病”。番茄双生病毒病是由于双生病毒科(Geminiviridae),菜豆金色花叶病毒属(Begomovirus)的双链DNA病毒引起的,常见的病毒包括,番茄黄化曲叶病毒(Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV)和甜菜曲顶病毒(Beet Curly Top Virus, BCTV)。番茄黄化曲叶病毒在我国每年造成超过20万公顷的病害,超过数十亿元的经济损失,并且每年以20%的速度蔓延,严重威胁我国千亿产值的番茄产业。为了应对病毒病害,我们通常需要筛选抗性番茄品种,筛选提高番茄抗性的农药和肥料,而前提条件就是有一种高效,稳定,操作简易的病毒接种方法。与传统嫁接法,基因枪法,烟粉虱法相比,农杆菌介导的接种法成本低并相对可控,但是过去农杆菌介导的叶片渗透或者茎注射法,操作相对繁琐,无法精准控制每一株番茄苗的接种量。不仅如此,如果进行大规模筛选工作,叶片渗透或者茎注射法将会产生巨大的工作量。

发明内容

[0003] 本发明通过优化农杆菌培养液和缓冲液配方,提供了一种高效,稳定,操作简易的农杆菌浸泡接种法,可以保证每一颗番茄苗的接种量一致,并且可以根据需要进行大规模筛选操作。本发明的目的是提供一种的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法,是一种可以对番茄高效、稳定、可重复的接种双生病毒的方法。

[0004] 本发明包括以下步骤:一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法,其特征在于,将含有双生病毒侵染性克隆的农杆菌,通过浸泡法接种番茄。

[0005] 优选,将番茄苗浸泡于含有双生病毒侵染性克隆的农杆菌AGL1菌液3-6小时后,转移到清水中继续浸泡12小时,然后移栽到营养土:蛭石体积比例为3:1混合的基质中继续培养。

[0006] 优选,当选用培养基萌发的只有两片真叶的番茄幼苗为材料接种病毒时,用注射器针尖刺伤番茄幼苗的根和下胚轴4-6次,获得农杆菌侵染的伤口,再进行农杆菌浸泡。

[0007] 优选,当选用已经长出4片复叶以上的,可用于扦插的番茄苗为材料接种病毒,浸泡前用小刀将番茄苗的茎切出45度的新鲜切面,再进行农杆菌浸泡。

[0008] 优选,浸泡番茄苗的菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$ 。

[0009] 优选,浸泡番茄苗时的温度为室温25度左右,浸泡时应避光。

[0010] 优选,将含有双生病毒侵染性克隆转化进入农杆菌AGL1中,农杆菌单克隆菌落用

相应抗性的LB培养基培养后,农杆菌重悬于完全诱导培养基中,培养后,农杆菌再重悬于1/4MS浸泡缓冲液中,获得农杆菌AGL1菌液,用于浸泡接种番茄苗;

[0011] 20×AB盐

	NH ₄ Cl	20 g
	MgSO ₄ -7H ₂ O	6 g
[0012]	KCl	3 g
	CaCl ₂	0.2 g
	FeSO ₄ -7H ₂ O	0.05 g

[0013]	加水	补齐 1 L
	高温高压灭菌	

[0014] 诱导培养基

	MES	9.76 g
	葡萄糖	5 g
	NaH ₂ PO ₄	0.24 g
[0015]	水	800 mL
	用 NaOH 调节 pH 到 5.6	
	加水	补齐 1 L
	高温高压灭菌	

[0016] 完全诱导培养基

[0017]	20×AB盐	50mL
	200mM乙酰丁香酮	1mL
	相应抗生素	x mL
	诱导培养基	补齐1L

[0018] 1/4MS浸泡缓冲液

	Murashige and Skoog 培养基粉末	1.1g
	蔗糖	10 g
	200 mM 乙酰丁香酮	1 mL
[0019]	Silwet L-77	100 μL
	去离子水	800 mL
	用 NaOH 调节 pH 到 6.0	
	加去离子水	补齐 1 L

[0020] 优选,所述的双生病毒侵染性克隆是中国番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆 pBinPLUS-1.7A和β环侵染性克隆pBinPLUS-2β;或甜菜严重曲顶病毒侵染性克隆。

[0021] 通过本发明提供的农杆菌介导的浸泡接种法,可以高效简易地将双生病毒中国番

茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)、甜菜严重曲顶病毒(Beet severe curly top virus, BSCTV) 侵染性克隆接种到不同品种的番茄, 通过发病症状的观察和PCR检测的证明, 本发明对各个时期的番茄苗均有极高的侵染效率。与传统嫁接法, 基因枪法, 烟粉虱法, 以及农杆菌注射法相比, 本发明所提供的方法不仅效率高, 成本低, 而且操作简易, 稳定性好, 可以保证每一株番茄苗的接种量一致, 并且可以根据需要扩大接种规模, 进而实现大规模的接种及筛选, 能为后续筛选抗性品种及番茄双生病毒病的研究提供技术上的有力支持。

附图说明

[0022] 图1: 双生病毒TYLCCNV与BSCTV接种番茄Ailsa Craig品种后的发病症状, 病毒DNA检测与侵染效率。

[0023] 图2: 双生病毒TYLCCNV与BSCTV接种番茄MoneyMaker品种后的发病症状, 病毒DNA检测与侵染效率。

[0024] 图3: 双生病毒BSCTV接种小番茄Micro-Tom品种的幼苗和四叶期番茄苗后的发病症状, 病毒DNA检测与侵染效率。

具体实施方式

[0025] 以下结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0026] 具体实施例仅是对本发明的解释, 其并不是对本发明的限制。本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改, 例如相应扩大培养体积以适应大规模筛选, 还或者用其他双生病毒侵染其他品种的番茄, 但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

[0027] 实施例

[0028] 一种高效简易的番茄双生病毒农杆菌浸泡接种法, 包括如下步骤:

[0029] 1、用已经发表的中国番茄黄化曲叶病毒(Tomato Yellow Leaf Curl China Virus, TYLCCNV) 侵染性克隆pBinPLUS-1.7A和β环侵染性克隆pBinPLUS-2β; (Cui et al., 2004); 和甜菜严重曲顶病毒(Beet Severe Curly Top Virus, BSCTV) 侵染性克隆pCambia1300-BSCTV1.8(Lai et al., 2009) 为本实施例的侵染性克隆。

[0030] 2、将双生病毒侵染性克隆(中国番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆pBinPLUS-1.7A、β环侵染性克隆pBinPLUS-2β或甜菜严重曲顶病毒侵染性克隆pCambia1300-BSCTV1.8), 通过液氮速冻, 37℃热激5分钟的热激法导入农杆菌AGL1菌株, 通过50mg/L卡那霉素和10mg/L利福平抗性LB平板筛选, 28℃倒置暗培养2天, 获得重组农杆菌单克隆。

[0031] 3、挑取重组农杆菌单克隆于5mL含有50mg/L卡那霉素和10mg/L利福平抗性的LB液体培养基中, 28℃, 200rpm振荡暗培养10-12小时, 得到农杆菌培养物。

[0032] 4、取上述农杆菌培养物0.5mL, 接种到200mL含有50mg/L卡那霉素和10mg/L利福平抗性的LB液体培养基中, 28℃, 200rpm振荡暗培养过夜, 得到农杆菌菌液。

[0033] 5、将上述过夜培养的农杆菌菌液3000rpm离心10min, 弃上清, 将农杆菌沉淀重悬于500mL含有50mg/L卡那霉素抗性的完全诱导培养基(表3)中, 28℃, 200rpm振荡暗培养过夜, 得到农杆菌菌液。

[0034] 6、将上述过夜培养的农杆菌菌液3000rpm离心10min,弃上清,将农杆菌沉淀重悬于500mL的1/4MS浸泡缓冲液(表4)中。检测OD₆₀₀,用1/4MS浸泡缓冲液稀释菌液到OD₆₀₀=1.0,用于番茄接种。

[0035] 7、病毒接种

[0036] 7.1如果选用培养基萌发的只有两片真叶的番茄幼苗为材料接种病毒,用注射器针尖刺伤番茄幼苗的根和下胚轴4-6次,获得农杆菌侵染的伤口,浸泡于上述OD₆₀₀=1.0的菌液中(将携带中国番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆pBinPLUS-1.7A的农杆菌菌液和携带β环侵染性克隆pBinPLUS-2β的农杆菌菌液按照体积比1:1混合去侵染,而携带甜菜严重曲顶病毒侵染性克隆pCambial300-BSCTV1.8的农杆菌菌液是单独侵染),室温避光浸泡3小时,将番茄苗转移到清水中,继续室温浸泡12小时。以接入空载体的农杆菌侵染作为对照。

[0037] 7.2如果选用长出4片复叶以上的番茄苗,用小刀将番茄苗的藤蔓切出45度的新鲜切面,将番茄苗浸泡于上述OD₆₀₀=1.0的菌液中,室温避光浸泡6小时后,将番茄苗转移到清水中,继续室温浸泡12小时。以接入空载体的农杆菌侵染作为对照。

[0038] 8、将番茄苗然后移栽到营养土:蛭石体积比例为3:1混合的基质中继续培养。

[0039] 9、分别在接种后10天和20天,观察番茄发病症状,取番茄新生顶叶为材料,提取DNA,用PCR检测病毒DNA含量。

[0040] 10.以番茄品种Ailsa Craig为侵染对象,接种TYLCCNV后20天左右出现发病症状(图1A),接种BSCTV后10天左右出现发病症状(图1B)。与接种空载体的对照组相比,接种病毒后的番茄叶片明显卷曲,顶芽生长明显受到抑制,植株整体矮化,侵染BSCTV后的发病症状更为严重(图1A,B)。PCR检测到TYLCCNV和BSCTV的病毒DNA,而对照组没有病毒DNA(图1C)。统计接种率表明,接种率达到100%(图1D)。

[0041] 11.以番茄品种Moneymaker为侵染对象,接种TYLCCNV后20天左右出现发病症状(图2A),接种BSCTV后10天左右出现发病症状(图2B)。与接种空载体的对照组相比,接种病毒后的番茄叶片明显卷曲,顶芽生长明显受到抑制,植株整体矮化,侵染BSCTV后的发病症状更为严重(图2A,B)。PCR检测到TYLCCNV和BSCTV的病毒DNA,而对照组没有病毒DNA(图2C)。统计接种率表明,接种率接近100%(图2D)。

[0042] 12.以小番茄品种Micro-Tom培养基萌发的只有两片真叶的番茄幼苗为材料,接种BSCTV后10天左右出现症状,接种2个半月后,对照组已经正常结果,而接种BSCTV的小番茄植株黄化,矮小,生长明显被抑制(图3A)。以小番茄品种Micro-Tom有四片复叶的番茄苗为材料接种BSCTV后10天出现症状,接种1个半月后,对照组发育正常,已经开花,而接种BSCTV的小番茄植株黄化,矮小,接种后生长明显被抑制(图3B)。PCR检测到BSCTV的病毒DNA,而对照组没有病毒DNA(图3C)。统计接种率表明,两种方法的接种率都达到100%(图3D)

[0043] Cui X,Tao X,Xie Y,Fauquet CM,Zhou X(2004)A DNAbeta associated with tomato yellow leaf curl China virus is required for symptom induction.J Virol 78:13966-13974

[0044] Lai,J.,Chen,H.,Teng,K.,Zhao,Q.,Zhang,Z.,Li,Y.,Liang,L.,Xia,R.,Wu,Y.,Guo,H.,Xie,Q.,2009.RKP,a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein,affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle.Plant J.57,905-917.

[0045] 表1

20× AB 盐	1 L
NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	6 g
[0046] KCl	3 g
CaCl ₂	0.2 g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.05 g
加去离子水	补齐 1 L

[0047] 高温高压灭菌

[0048] 表2

诱导培养基	1 L
2- (N-吗啉代) 乙磺酸 (MES)	9.76 g
葡萄糖	5 g
[0049] NaH ₂ PO ₄	0.24 g
去离子水	800 mL
用 NaOH 调节 pH 到 5.6	
加去离子水	补齐 1 L
高温高压灭菌	

[0050] 表3

完全诱导培养基	1 L
20× AB 盐 (已灭菌)	50 mL
[0051] 200 mM 乙酰丁香酮 (无菌)	1 mL
相应抗生素* (无菌)	x mL
诱导培养基 (已灭菌)	补齐 1 L
* 利福平不是必需。	

[0052] 表4

[0053]

1/4 MS 浸泡缓冲液	1 L
Murashige and Skoog 培养基粉末	1.1g
蔗糖	10 g
200 mM 乙酰丁香酮	1 mL
Silwet L-77	100 μ L
去离子水	800 mL
用 NaOH 调节 pH 到 6.0	
加去离子水	补齐 1 L
现配现用，无需灭菌。	

Solanum lycopersicum cultivar **Ailsa Craig**

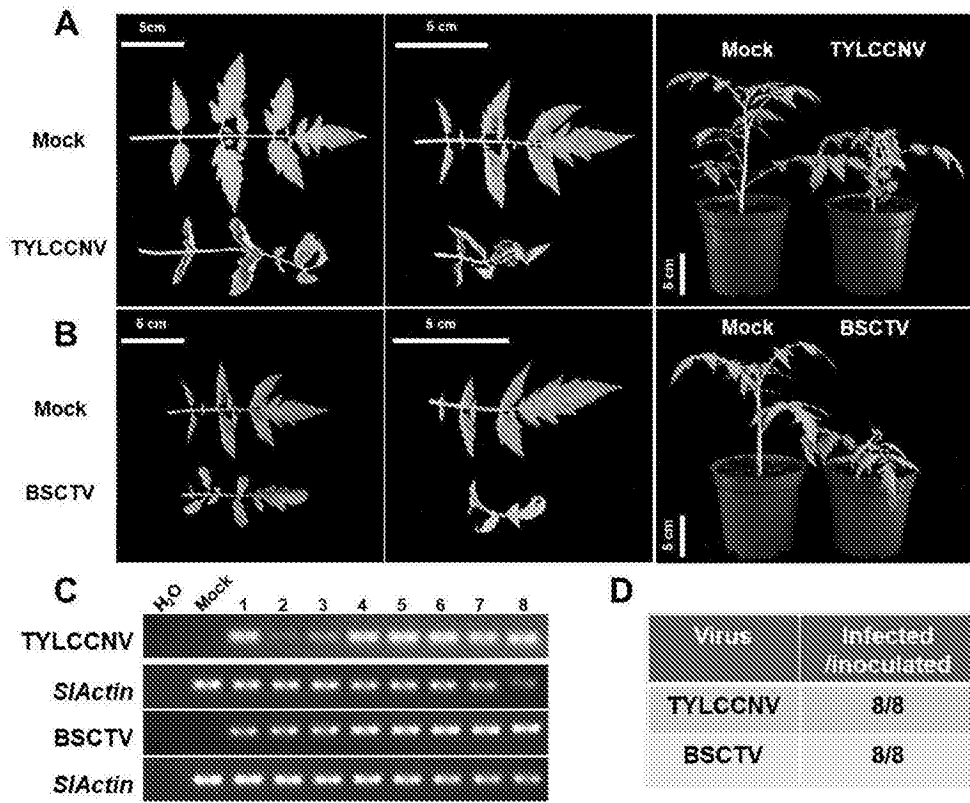


图1

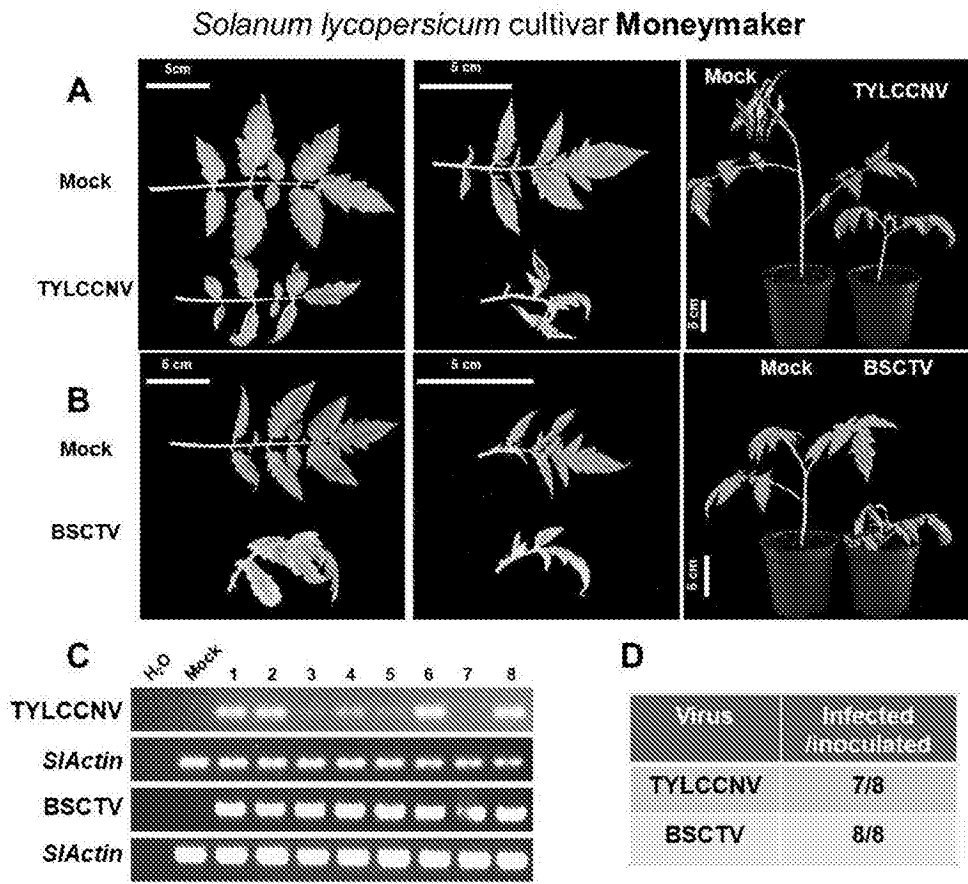


图2

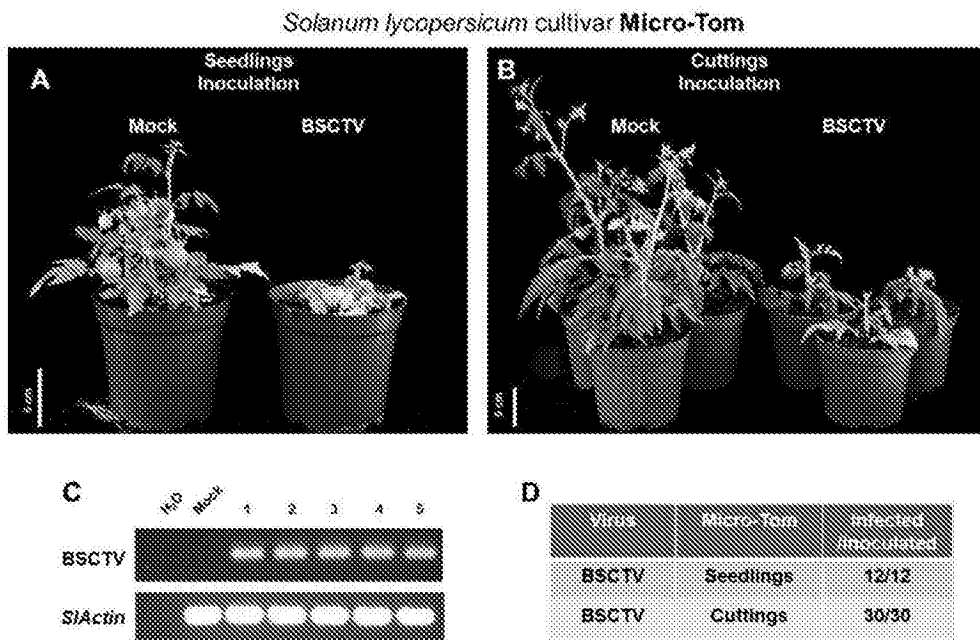


图3