

湖北省江陵县马铃薯黄萎矮化病病原鉴定

章松柏^{1,2}, 周 焱¹, 方守国¹, 郭灵芳^{3*}, 谢长炜², 吴祖建²

(1. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 福建农林大学 植物病毒研究所, 福建 福州 350002;

3. 长江大学 工程技术学院, 湖北 荆州 434020)

摘要: 湖北省江陵县马铃薯种植过程中发生严重的黄萎矮化病, 造成了马铃薯产量的巨大损失, 通过症状描述、电镜观察、RT-PCR 检测对其病原进行初步检测和分析, 以期研究该病害的防控方法提供依据。结果显示: 病组织保湿培养 48 h 无异味, 无菌丝和菌脓产生。检测样品的根组织内均大量存在 2 种病毒颗粒, 一种为线状病毒, 有 3 种大小不同的粒体, 即 $(12\sim14)\text{nm}\times(450\sim600)\text{nm}$ 、 $(12\sim14)\text{nm}\times(700\sim900)\text{nm}$ 、 $(12\sim14)\text{nm}\times(1\,500\sim2\,000)\text{nm}$; 另一种为杆状病毒, 有 2 种大小不同的粒体, 即 $(24\sim30)\text{nm}\times(300\sim500)\text{nm}$ 、 $(24\sim27)\text{nm}\times(1\,000\sim1\,300)\text{nm}$ 。RT-PCR 和序列分析表明, 线状病毒为马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY), 杆状病毒归属还有待于进一步研究。结合试验结果和相关报道, 初步认为湖北省江陵县马铃薯黄萎矮化病是由马铃薯 Y 病毒(和未知杆状病毒)侵染引起的。

关键词: 马铃薯; 马铃薯黄萎矮化病; 马铃薯 Y 病毒; 电镜观察; RT-PCR 检测

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0080-04

Identification of Pathogens Causing Potato Yellow Wilt and Dwarf Disease in Jiangling County, Hubei Province

ZHANG Song-bai^{1,2}, ZHOU Yi¹, FANG Shou-guo¹, GUO Ling-fang^{3*},

XIE Chang-wei², WU Zu-jian²

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;

2. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. College of Technology & Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434020, China)

Abstract: In March to May of 2013, potato yellow wilt and dwarf disease occurred seriously and caused great yield losses in some potato cultivars production in Jiangling county, Hubei province. By symptoms observation, electron microscopic observation, RT-PCR assay and sequence analysis, the pathogens of the disease were preliminarily detected. The results showed that no odor, hyphae and bacterial beads were produced from diseased tissues when cultured by moisturizing for 48 h under 25 °C. Two types of virion, bacilliform virion and linear virion, were detected from the juice of diseased potato roots, and the sizes of the linear virion were $(12-14)\text{nm}\times(450-600)\text{nm}$, $(12-14)\text{nm}\times(700-900)\text{nm}$, $(12-14)\text{nm}\times(1\,500-2\,000)\text{nm}$, and those of bacilliform virion were $(24-30)\text{nm}\times(300-500)\text{nm}$, $(24-27)\text{nm}\times(1\,000-1\,300)\text{nm}$. The linear virus was determined as potato virus Y(PVY) by RT-PCR and sequence analysis, but the bacilliform virus needed further researching. Based on the experimental results above and related reports, PVY, perhaps mixed with the bacilliform virus, was the main pathogen of the disease.

Key words: *Solanum tuberosum*; potato yellow wilt and dwarf disease; potato virus Y; electron microscopic observation; RT-PCR analysis

收稿日期: 2013-07-08

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303028); 长江大学工程技术学院教研项目(JY201229)

作者简介: 章松柏(1978-), 男, 湖北黄梅人, 讲师, 博士, 主要从事植物病毒监测与分子病毒学研究。

E-mail: yangtze2008@126.com

* 通讯作者: 郭灵芳(1977-), 女, 湖北黄梅人, 讲师, 硕士, 主要从事化学生物学研究。E-mail: glf0498104@163.com

马铃薯是世界第四大粮食作物,仅次于小麦、水稻和玉米,分布广泛,目前我国马铃薯栽培面积和总产量均居世界第1位,分别约为500万 hm^2 和7000万 t ^[1-2]。马铃薯在种植过程中,易受多种病毒的侵染,不仅破坏寄主植物正常的生理活动,而且还通过马铃薯块茎逐代积累而传播,导致马铃薯退化,失去继续使用和种植的价值,造成产量损失,严重时减产可达80%以上^[3-5]。因此,马铃薯病毒病及其导致的种薯退化是影响马铃薯生产持续发展的一个重要因素。侵染马铃薯的病毒种类有25种以上,其中以马铃薯命名的有16种^[6-7]。在我国广大马铃薯产区对马铃薯危害严重的病毒有7种:马铃薯Y病毒(potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(potato leaf roll virus, PLRV)、马铃薯S病毒(potato virus S, PVS)、马铃薯A病毒(potato virus A, PVA)、马铃薯X病毒(potato virus X, PVX)、马铃薯M病毒(potato virus M, PVM)及马铃薯纺锤形块茎类病毒(potato spindle tuber viroid, PSTVd)^[8-9]。马铃薯病毒病田间表现症状复杂多样,常见的症状可分为四大类型。(1)花叶型:叶面出现淡绿、黄绿和浓绿相间的斑驳花叶,叶片基本不变小或变小、皱缩,植株矮化。(2)卷叶型:叶缘向上卷曲,甚至呈圆筒状。(3)坏死型(或称条斑型):叶脉、叶柄、茎枝出现褐色坏死斑或连合成条斑,甚至叶片萎垂、枯死或脱落。(4)丛枝及束顶型:分枝纤细而多,缩节丛生或束顶,叶小花少,明显矮缩^[10]。2013年3—5月,湖北省江陵县马铃薯种植过程中有2个品种(费乌瑞它和中薯1号)发生严重的黄萎矮化病,造成了这2个马铃薯品种产量的巨大损失。为此,通过症状描述、电镜观察、RT-PCR检测等方法对其病原进行初步检测和鉴定,以期研究该病害的防控方法提供依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

马铃薯材料采自湖北省江陵县同一种植区的健康田和发病田,发病品种为费乌瑞它和中薯1号,健康品种为早大白,部分病、健株材料保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,部分种植于防虫温室中,病、健株薯块分别冲洗晾干后室温保持于干燥环境中备用。

1.2 症状观察和组织保湿培养

于健康和发病田仔细观察马铃薯生长和发病情况,调查发病田块前作情况,对照健康植株观察病株叶片颜色、有无变形,叶脉、茎、叶柄是否出现褐色坏死斑,根生长情况以及根茎内部维管束有无变化,植

株有无矮化现象,病田有无发病中心。取病株根和茎部组织,清水冲洗后,于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保湿培养48 h,观察有无异味和菌丝(或菌脓)产生。

1.3 电镜观察

采用汁液负染法^[11]:取发病样品根组织加入PBS缓冲液(pH值7.0)充分研磨,10000 g离心1 min,取上清液备用。用铺有Formvar膜的电镜铜网沾取上述病毒汁液吸附10 min,然后用滤纸吸干,加2%磷钨酸(pH值7.0)或2%醋酸铀(pH值4.0)1滴,染色5 min,再吸干,待干燥后,于透射电镜下观察有无病毒颗粒。

1.4 RT-PCR检测

取发病品种病株根组织和薯块(费乌瑞它品种2株、中薯1号品种3株),以健康的早大白品种根组织和薯块作为对照,选用实验室保存的常见马铃薯病毒(PVA、PVY、PVX、PVS、PVM、PLRV)检测引物进行检测^[12]。根组织和薯块总RNA采用Trizol试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取,最后用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的无核酸酶灭菌水溶解。反转录采用Oligo(dT)₁₆引物按照反转录试剂盒(Fermentas公司)说明进行操作。PCR反应体系按照TaKaRa的*rTaq*酶使用说明进行,反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性4 min,32个循环的扩增($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s),最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,取部分PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后采用BioRad凝胶成像系统观察记录。

1.5 扩增片段的克隆和序列分析

将RT-PCR扩增所得的检测片段连接至pMD18-T载体(TaKaRa公司),转化克隆经验证后委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。运用DNA-MAN软件(Lynnon Biosoft Inc.)对所获序列进行加工整理和同源性分析。

2 结果与分析

2.1 田间发病症状及组织保湿培养结果

田间观察发现,马铃薯发病品种主要为费乌瑞它和中薯1号,早期底层叶片开始黄化(图1A),后期出现黄萎现象(图1C),田间植株死亡率达到50%(图1E),存活的植株叶片黄化率达到90%以上,而同区域种植的早大白未出现黄化症状;发病植株明显矮化,株高仅为同区域早大白品种高度的3/4左右;叶片未出现花叶症状,叶脉、叶柄和茎部也无坏死斑,但根茎部维管束出现褐变(图1B);薯块明显偏小,形状不规则,部分薯块表面有坏死斑(图1D)。田间植株普遍发病,无明显的发病中心。对

病组织保湿培养发现,病组织无异味,也无菌丝或菌脓产生。此外,调查得知,前作是水稻,种薯从北方调运而来。

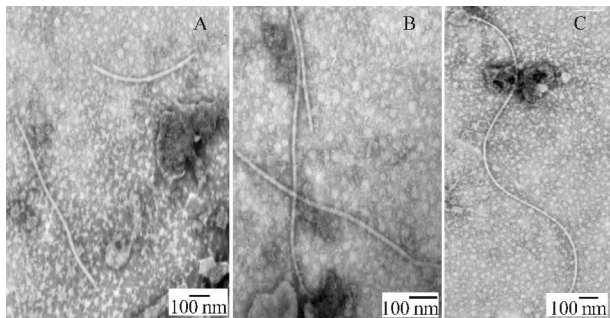


A. 叶片黄化; B. 茎维管束变褐; C. 植株矮化、黄萎;
D. 薯块偏小、形状不规则; E. 田间大面积黄萎、死亡

图 1 马铃薯黄萎矮化病症状

2.2 电镜观察结果

电镜观察显示,所检测的 5 个病株根组织样品中均大量存在 2 种病毒颗粒,一种为线状病毒,有 3 种大小不同的颗粒,即 $(12\sim14)\text{ nm}\times(450\sim600)\text{ nm}$ 、 $(12\sim14)\text{ nm}\times(700\sim900)\text{ nm}$ 、 $(12\sim14)\text{ nm}\times(1\,500\sim2\,000)\text{ nm}$ (图 2);另一种为杆状病毒,有 2 种大小不同的颗粒,即 $(24\sim30)\text{ nm}\times(300\sim500)\text{ nm}$ 、 $(24\sim27)\text{ nm}\times(1\,000\sim1\,300)\text{ nm}$ (图 3)。



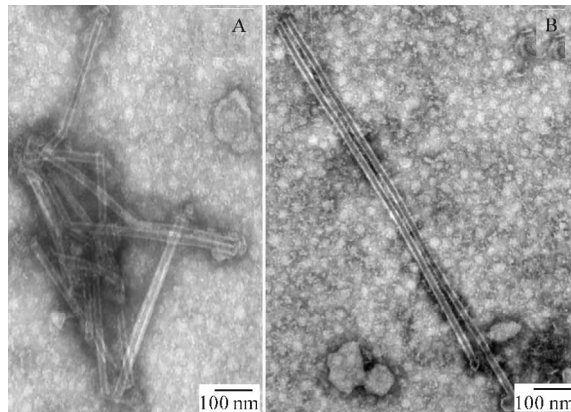
A. 大小为 $(12\sim14)\text{ nm}\times(450\sim600)\text{ nm}$ 的颗粒;
B. 大小为 $(12\sim14)\text{ nm}\times(700\sim900)\text{ nm}$ 的颗粒;
C. 大小为 $(12\sim14)\text{ nm}\times(1\,500\sim2\,000)\text{ nm}$ 的颗粒

图 2 线状病毒的 3 种颗粒形态

2.3 RT-PCR 鉴定结果

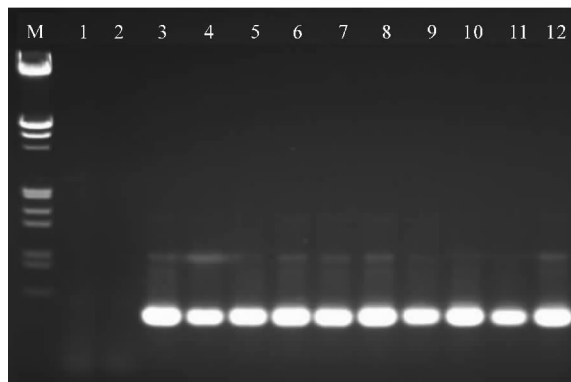
待检测样品总 RNA 用 Oligo(dT)_{16} 反转录后,用检测 PVA、PVY、PVX、PVS、PVM、PLRV 的特异性引物分别对反转录产物进行 PCR 扩增,结果仅 PVY 的特异性引物能够扩增出相应条带(大小为 379 bp),如图 4 所示。运用 DNAMAN 软件对所测

定的序列进行加工整理和同源性分析,结果显示,所测的 10 个克隆序列一致,与 PVY-ShX14、PVY-SC8、PVY-NMG13、PVY-Heilongjiang、PVY-Zhengzhou 等分离物相应序列的同源性在 99.7% 以上。



A. 大小为 $(24\sim30)\text{ nm}\times(300\sim500)\text{ nm}$ 的颗粒;
B. 大小为 $(24\sim27)\text{ nm}\times(1\,000\sim1\,300)\text{ nm}$ 的颗粒

图 3 杆状病毒的 2 种颗粒形态



M. DNA 分子量标准($\lambda\text{DNA}/\text{EcoR I} + \text{Hind III}$);
1—2. 健康马铃薯根和块茎; 3—8. 中薯 1 号品种根组
织和块茎; 9—12. 费乌瑞它品种根组织和块茎

图 4 PVY 特异性引物扩增检测的结果

3 结论与讨论

2013 年 3—5 月,湖北省江陵县马铃薯种植过程中发生严重的黄萎矮化病,调查显示,田间植株普遍发病,无明显的发病中心,尽管马铃薯病毒病存在黄化矮缩现象,但很少出现黄萎现象^[10,13-16],因此,最初怀疑是土传性病害所致^[17],但保湿培养发现,病组织无异味,也无菌丝产生,同时前作是水稻,所以土传病害的可能性较小。鉴于种薯是从北方调运而来,且种植过程中温度较低,虫量较小,因此推测可能是种薯普遍带毒所致。通过电镜观察,证实在发病马铃薯植株中存在大量的病毒颗粒,包括线状病毒和杆状病毒,未观察到弹状病毒颗粒的存在,排除了马铃薯黄萎病毒引起的可能性^[15]。进一步通过 RT-PCR 和序

列分析证实线状病毒是 PVY, 杆状病毒归属还有待进一步研究。PVY 是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的代表种^[18-19]。在北美地区, PVY 存在有很多株系, 包括 PVY^O、PVY^C、PVY^N、PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 等, 病毒株系不同导致产生不同的症状^[16, 20]。PVY^O 侵染不同马铃薯品种时, 引起的叶片症状也有所不同, 包括轻一重花叶、卷叶、脉间褪绿黄化/坏死、叶脉坏死、全叶褪绿黄化/坏死等, 但 PVY^O 侵染烟草时, 不引起叶脉坏死, 而 PVY^N、PVY^{NTN}、PVY^{N-Wi} 均可以引起烟草叶脉坏死, PVY^{NTN} 除了引起烟草叶脉坏死外, 还可以引起马铃薯茎坏死, 从而引起植株萎蔫或死亡^[16, 21-22]。我国新疆地区马铃薯生产中也出现黄化矮化现象, 安仙丽等通过检测发现, 引起马铃薯黄矮病毒病的病原种类有多种, 包括 PVY、PVS、PVA、PLRV、PSTVd 等, 以 PVY 为优势病毒种类, 占检出病原总数的 32.28%^[13-14]。因此, 结合本试验结果和相关报道, 初步认为湖北省江陵县马铃薯黄萎矮化病是由马铃薯 Y 病毒(和未知杆状病毒复合)侵染引起的。

参考文献:

- [1] Xu X, Pan S, Cheng S, *et al.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato[J]. *Nature*, 2011, 475: 189-195.
- [2] 屈冬玉, 谢开云, 金黎平, 等. 中国马铃薯产业发展与食品安全[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 358-362.
- [3] 田波, 张广学, 张鹤龄, 等. 马铃薯无病毒种薯生产的原理和技术[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 16-24.
- [4] 郭志乾, 董凤林. 马铃薯病毒性退化与防治技术[J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(1): 48-49.
- [5] Chakraborty A. Degeneration of potato cultivars due to viral diseases in the plains of West Bengal[J]. *Journal of Mycopathological Research*, 2012, 50(2): 345-346.
- [6] Singh R P. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention[J]. *Genome*, 1999, 42: 592-604.
- [7] 谢联辉, 林奇英, 吴建建. 植物病毒名称及其归属[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 137-142.
- [8] 刘全永. 马铃薯病毒检测及其抗病毒基因工程研究进展[J]. *生物学通报*, 2001, 36(1): 12-13.
- [9] 白云凤, 闫建俊, 张耀, 等. 马铃薯纺锤块茎类病毒山西分离物侵染性克隆的构建[J]. *山西农业科学*, 2012, 40(7): 701-704.
- [10] 李芝芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [11] 夏更寿, 郭志平. 马铃薯病毒试管苗保存技术及病毒侵染力的研究[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2007, 28(4): 103-105.
- [12] 谢长伟. 福建马铃薯病毒病的快速检测技术[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [13] 安仙丽. 北疆地区马铃薯黄矮病的初步研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
- [14] 安仙丽, 向本春, 姜玉霞. 北疆马铃薯黄矮病发生及危害情况调查[J]. *新疆农业科学*, 2008, 45(2): 292-297.
- [15] EPPO. Potato yellow dwarf virus[J]. *EPPO Bulletin*, 1980, 10(1): 41-46.
- [16] Gray S, De Boer S, Lorenzen J, *et al.* An evolving concern for potato crops in the United States and Canada [J]. *Plant Disease*, 2010, 94(12): 1384-1397.
- [17] 刘宝康, 李刚, 刘汉文. 马铃薯早死病种薯带菌研究[J]. *植物保护*, 1992(2): 8-10.
- [18] 洪健, 周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类[J]. *中国病毒学*, 2006, 21(1): 84-86.
- [19] Büchen-Osmond C. The universal virus database: IC-TVdB[M/OL]. Version 4. New York: Columbia University, 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IC-TVdb>.
- [20] Singh R P, Valkonen J P T, Gray S M, *et al.* Discussion paper: The naming of potato virus Y strains infecting potato [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153: 1-13.
- [21] Le Romancer M, Kerlan C, Nedellec M. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers[J]. *Plant Pathology*, 1994, 43: 138-144.
- [22] Ohshima K, Sako K, Hiraishi C, *et al.* Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan; Its association with potato virus Y necrotic strain[J]. *Plant Disease*, 2000, 84: 1109-1115.