

我国部分马铃薯产区主要病毒病发生情况调查

吴兴泉¹, 张慧聪¹, 时妍¹, 孙强², 陈士华^{1*}

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 黑龙江北大荒农业股份有限公司 八五四分公司, 黑龙江 虎林 158403)

摘要: 为探明我国马铃薯产区主要病毒病的发生情况, 采用 RT-PCR 技术对我国 9 个省、市 16 个马铃薯种植区的田间马铃薯病毒病发生情况进行了调查。结果表明: 马铃薯 Y 病毒(PVY)检出率最高, 达到 94%, 其次是马铃薯 S 病毒(PVS)和马铃薯 A 病毒(PVA), 检出率分别为 50%、44%。其中 PVA 在贵州省、PVS 在河南省和吉林省的发生尚属首次报道。病毒复合侵染情况普遍, 复合侵染率达 81.3%。另外, 对我国部分地区脱毒试管苗和脱毒种薯的带毒情况进行检测, 结果表明: 在脱毒试管苗中 4 种病毒均有检出, 其中 PVS 检出率最高(22.2%), 其次为马铃薯卷叶病毒(PLRV)、PVY 和 PVA, 但在脱毒种薯中未检出病毒。我国马铃薯田间病毒病发生普遍, 且多为复合感染。

关键词: 马铃薯; 病毒; 复合侵染; RT-PCR 技术

中图分类号: S436.32 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)07-0084-04

Survey of Important Potato Viruses in Some Potato Planting Areas in China

WU Xing-quan¹, ZHANG Hui-cong¹, SHI Yan¹, SUN Qiang², CHEN Shi-hua^{1*}

(1. College of Biotechnology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. 854 Branch, Heilongjiang Great Northern Wilderness Agriculture Co., Ltd., Hulin 158403, China)

Abstract: In order to know the occurrence of potato viruses in some potato planting areas, the occurrence of main potato viruses in 16 potato planting areas of 9 provinces in China was investigated with RT-PCR technology. The results showed that the virus with the highest detection rate (94%) was PVY, followed by PVS and PVA with the detection rate of 50% and 44%, respectively. It was the first report for the occurrence of PVA in Guizhou province, and PVS in Henan province and Jilin province. The mixed infection of potato viruses was common and the infection efficiency was 81.3%. The viruses in virus-free plantlet *in vitro* and virus-free seed potato from partial regions were also detected. The results showed that four viruses were all detected in the virus-free plantlet *in vitro*, of which PVS had the highest detection rate (22.2%), followed by PLRV, PVY and PVA, but no virus was detected in the virus-free seed potato. Potato virus diseases are widespread in potato planting areas in China and the mixed infection of potato viruses is common.

Key words: potato; virus; mixed infection; RT-PCR

马铃薯是世界四大粮食作物之一, 也是我国第四大粮食作物。目前, 我国已成为世界上最大的马铃薯生产国, 马铃薯的产量和种植面积均居世界第 1 位^[1]。病毒病是马铃薯生产中非常重要的一类病

害^[2], 分布于世界各马铃薯种植区。病毒的侵染可以引起马铃薯种质退化, 导致产量急剧下降。在我国, 各马铃薯主产区均有马铃薯病毒病的发生^[3-7], 其危害已成为制约马铃薯生产的主要因素之一。当

收稿日期: 2012-12-22

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划项目(2012HASTIT016)

作者简介: 吴兴泉(1970-), 男, 黑龙江克山人, 教授, 博士, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: wuxq70@126.com

* 通讯作者: 陈士华(1972-), 女, 黑龙江克东人, 副教授, 主要从事分子生物学与生物信息学研究。

前马铃薯病毒病的防治策略主要有 3 个:生产脱毒种薯、选育抗病毒病品种、利用抗病毒物质。虽然在控制马铃薯病毒病的研究中各个方面均取得了显著的成效,但在马铃薯生产中控制马铃薯病毒病最有成效的手段仍然是脱毒种薯的生产和应用^[8-9]。为此,我国也正在逐步建立健全脱毒种薯认证体系,以促进生产中脱毒种薯普及率的提高。本研究对我国 9 个省、市 16 个地区的田间马铃薯样本进行了病毒检测,以期更好地了解我国马铃薯上病毒病的发生及危害情况,为实际生产中马铃薯病毒病的防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒(天根

生化科技有限公司)、PrimeScript RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)、Ex Taq HS DNA Polymerase(大连宝生物工程有限公司)、琼脂糖(西班牙原装)、核酸分子量标准品 100 bp DNA Ladder(上海莱枫生物科技有限公司)等。

1.1.2 马铃薯病毒 PCR 检测中所用引物 根据 GenBank 数据库中已公布的山铃薯卷叶病毒(PLRV)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯 A 病毒(PVA)的基因组序列,运用 Clustal X 软件对 4 种病毒基因组进行保守性分析,利用 Primer Premier 5 设计 4 种病毒的引物序列(表 1),由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。将所合成的上、下游引物用无核酸酶的双蒸水分别配制成 100 mmol/L 的母液保存,使用时将 4 对引物的母液稀释成 10 mmol/L 的工作液。

表 1 马铃薯主要病毒 PCR 检测所用引物

病毒	引物名称	引物序列	扩增片段长度/bp	退火温度/℃
PLRV	R1	5'-gacgaaccccgatacaaac-3'	841	52
	R2	5'-gcgtctttcgacggtctct-3'		
PVS	S1	5'-aattcaacattgagcaacatctc-3'	680	50
	S2	5'-tgattgcgcacaaatctcagc-3'		
PVY	Y1	5'-gcaactcaatcacagtttga-3'	537	55
	Y2	5'-gtagagtatgcatacttgga-3'		
PVA	A1	5'-gatgtcgatttaggtactgc-3'	376	50
	A2	5'-gccttaagaaggtttgcatg-3'		

1.2 检测方法

1.2.1 马铃薯样品总 RNA 提取 根据北京天根公司植物总 RNA 提取试剂盒(RNAPrep pure Plant Kit)的方法进行马铃薯样品总 RNA 的提取。

1.2.2 反转录反应 在 PCR 反应管中分别加入马铃薯样品总 RNA 3 μ L、随机引物 1 μ L、dNTP 混合物(各 10 mmol/L)1 μ L、RNase-free H₂O 5 μ L。将上述混合物置于 65 $^{\circ}$ C 下变性 5 min 后,迅速置于冰上冷却 2 min 以上。在上述 PCR 反应管中依次加入下列试剂:5 \times PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript 反转录酶 0.5 μ L, RNase-free H₂O 5 μ L。将反应管置于 30 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,再 42 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,即得到 cDNA 溶液,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 聚合酶链式反应 以上述反转录产物为模板,利用各病毒特异性引物,采用常规方法进行 PCR 扩增检测。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,借助 Bio-Rad 紫外-可见凝胶成像仪进行观察。

1.3 我国部分地区田间马铃薯病毒病的发生情况调查

采集了我国 9 个省、市(黑龙江、吉林、辽宁、河

南、贵州、湖南、福建、甘肃、北京)16 个地区的田间马铃薯样品(叶片或块茎),采用所建立的山铃薯病毒检测技术对样品进行 4 种病毒(PLRV、PVS、PVY、PVA)的检测,将各地区样品感染病毒情况进行整理分析。

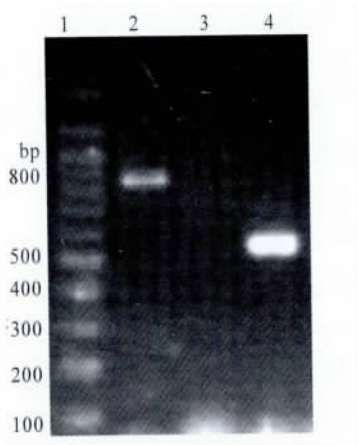
1.4 脱毒试管苗及脱毒种薯的山铃薯病毒检测

对来自河南省和黑龙江省的 36 份脱毒试管苗和 8 份脱毒种薯进行了马铃薯病毒的检测及发病率分析。脱毒试管苗的芽端比茎部、根部的染毒量低,为了得到准确的检测结果,对整个试管苗植株进行了平均取样检测。

2 结果与分析

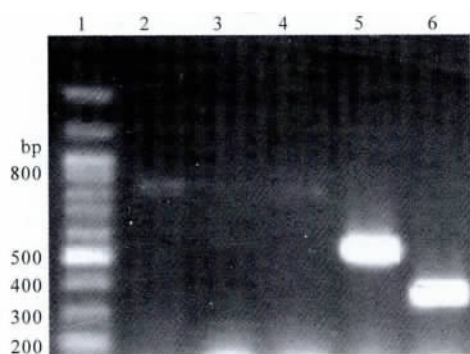
2.1 我国部分地区田间马铃薯病毒病发生情况调查结果

采集了我国 9 个省、市共 16 个地区的田间马铃薯疑似带毒样本,通过 RT-PCR 检测方法对其进行病毒检测,部分样本的电泳检测结果见图 1—3。由图 1—3 可知,PCR 扩增得到的病毒靶带清晰,不同地区的样品感染病毒的种类不同,有的样品为马铃薯病毒单一侵染,但多数样品为马铃薯病毒复合侵染。



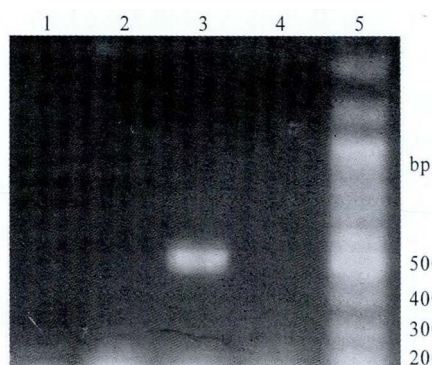
1. 100 bp DNA Ladder; 2. PLRV 检测结果;
3. PVS 检测结果; 4. PVY 检测结果

图 1 贵阳市马铃薯田间样本的病毒检测结果



1. 100 bp DNA Ladder; 2, 4. PLRV 检测结果;
3. PVS 检测结果; 5. PVY 检测结果;
6. PVA 检测结果

图 2 遵义市马铃薯田间样本的病毒检测结果



1. PVA 检测结果; 2. PLRV 检测结果;
3. PVY 检测结果; 4. PVS 检测结果;
5. 100 bp DNA Ladder

图 3 北京市马铃薯田间样本的病毒检测结果

由表 2 可以看出,我国马铃薯田间病毒复合侵染的情况比较普遍,复合侵染率达 81.3%。PVS、PVY、PVY 和 PVA 等病毒均有检出,其中 PVY 发生最为普遍,绝大部分地区都受到了 PVY 的侵染,其检出率达到 94%,其次是 PVS,检出率达到 50%。

表 2 我国部分地区田间马铃薯病毒病发生情况

省/市	地区	PLRV	PVS	PVY	PVA
黑龙江	克山	+	+	+	+
吉林	吉林		+	+	
辽宁	大连		+	+	
	阜新		+	+	
北京	北京			+	
河南	郑州		+	+	
	信阳		+	+	
	民权			+	
贵州	贵阳	+		+	+
	遵义	+		+	+
	草海				+
	安顺		+	+	
	息烽	+		+	+
湖南	郴州			+	+
甘肃	武威		+	+	
福建	厦门			+	+
检出率/%		25	50	94	44

注:“+”表示检测到该病毒。

2.2 脱毒试管苗及脱毒种薯的马铃薯病毒检测结果

利用 RT-PCR 对来自我国部分马铃薯脱毒中心的共 36 份脱毒试管苗和 8 份脱毒种薯进行了 PLRV、PVS、PVY、PVA 的感染情况检测,结果见表 3。由表 3 可以看出,在脱毒种薯中未检出病毒,但在脱毒试管苗中 4 种病毒均有检出,其中 PVS 检出率最高(22.2%),其后依次为 PLRV(13.9%)、PVY(11.1%)、PVA(8.3%)。

表 3 马铃薯脱毒试管苗及脱毒种薯样品病毒检测结果

样本类型	样品 总数/份	带毒样品数/份			
		PLRV	PVS	PVY	PVA
脱毒试管苗	36	5(13.9)	8(22.2)	4(11.1)	3(8.3)
脱毒种薯	8	0	0	0	0

注:括号中为病毒的检出率(%)。

3 讨论

3.1 我国部分地区田间马铃薯病毒病发生情况

本研究对来自我国东北(黑龙江、吉林、辽宁)、华北(北京)、西北(甘肃)、西南(湖南、贵州)、东南(福建)及中原(河南)共 16 个地区的田间马铃薯疑似带毒样本进行了检测,结果显示,大多数地区田间马铃薯均受到 2 种以上病毒侵染,说明马铃薯病毒复合侵染较普遍。PVY 检出率最高(达到 94%),其次是 PVS 和 PVA,侵染率在 50%左右。查阅文献^[10]发现,PVA 在贵州省、PVS 在河南省和吉林省

的发生尚属首次报道。

通过检测结果可以看出,在我国很多地区马铃薯田间检出了PVA,并且检出率较高。但是我国现有的很多马铃薯脱毒种薯病毒检验标准中还未将PVA列入检验对象,原因可能是在一些马铃薯品种上,PVA侵染只表现出轻微症状,有时则不显症,因此忽视了对PVA的调查,没有制定严格的检疫措施。但是,PVA可以与PVX或PVY复合侵染,并对马铃薯的生产造成严重危害,减产可达80%,因此,需要制定严格的检疫措施^[11],以确保对PVA的有效防控。

3.2 脱毒试管苗及脱毒种薯的带毒情况

本研究对河南省和黑龙江省的部分马铃薯脱毒试管苗和脱毒种薯进行了4种马铃薯主要病毒的检测,结果显示,虽然进行了脱毒处理,但部分样品中仍然检测出了马铃薯病毒。在脱毒试管苗中除了检测出PVS外,还检测出了PLRV、PVY和PVA,可能是脱毒不完全或由于在脱毒种苗繁育过程中隔离措施不当,引起了病毒的再次侵染。因此,应加强脱毒种苗的病毒检测,发现后及时淘汰带毒种苗,避免因漏检或脱毒不完全而对种薯生产造成影响,从而有效地控制种薯质量。

参考文献:

- [1] 吴兴泉. 马铃薯病毒的检测与防治[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2009: 10-35.
- [2] 张华鹏, 张剑峰, 刘俊莹, 等. 马铃薯上PVY、PVS和PLRV的三重RT-PCR检测[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 40-45.
- [3] 刘洪义, 张洪祥, 李明福, 等. 黑龙江省马铃薯病毒病的普查及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 307-310.
- [4] 钟婷婷, 蒲志刚, 何俊蓉, 等. 四川省马铃薯主产区最新病毒病普查及血清学鉴定[J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 96-99.
- [5] 张仲凯, 丁铭, 方琦, 等. 云南马铃薯病毒种类及脱病毒种苗筛选技术体系[J]. 云南农业科技, 2003(增刊): 121-130.
- [6] 王培伦, 王振东, 杨元军, 等. 山东省脱毒马铃薯研究进展及推广现状[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(3): 154-157.
- [7] 白艳菊, 文景芝, 杨明秀, 等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.
- [8] 张琼, 孙永平, 夏明霞, 等. 江苏丘陵地区马铃薯脱毒种薯栽培试验研究[J]. 天津农业科学, 2012, 18(6): 129-130.
- [9] 董文琦, 戴素英. 高产低耗规模化生产脱毒马铃薯原原种研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(z1): 206-208.
- [10] 吴兴泉, 时妍, 杨庆东. 我国马铃薯病毒的种类及脱毒种薯生产过程中病毒的监测[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(6): 363-366.
- [11] 张洪峰, 陈阳婷, 孟兴, 等. 马铃薯A病毒及其风险分析[J]. 植物检疫, 2010, 24(4): 48-51.