

日本紫色甘薯常见病毒病的检测

杨贤松¹, 张俊广², 高峰^{1,3*}, 房伯平⁴, 陈景益⁴

(1. 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715; 2. 桂林医学院生物技术学院, 广西 桂林 541004;

3. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631; 4. 广东省农业科学院作物研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 采用硝化纤维素膜酶联免疫吸附检测法(NCM-ELISA)和症状诊断法, 对从日本引进的紫色甘薯病毒病发生情况进行检测。NCM-ELISA 检测结果表明, 从日本引进的紫色甘薯分别感染了甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、甘薯轻度斑驳花叶病毒(SPMV)、甘薯褪绿斑点病毒(SPCFV)、甘薯潜隐病毒(SPLV)、C-6 病毒和 C-8 病毒。其中, SPFMV 和 SPMV 感染最普遍, SPCFV 和 SPLV 次之, 而 C-6 和 C-8 感染较少。在供试的 14 个日本紫色甘薯品种(系)中, A4、A5 和山川紫等 3 个品系(种)感染上述全部 6 种病毒, 其余 11 个甘薯品系只是感染了其中几种病毒; 症状观察结果表明, 感染病毒的紫色甘薯叶片出现明显的症状, 主要表现为褪绿斑驳、畸形、坏死、变色等 4 种类型。

关键词: 紫色甘薯; 病毒检测; ELISA; 症状

中图分类号: S435.311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2005)02-0034-05

Virus Detection on Purple Sweet Potato Introduced from Japan

YANG Xian-song¹, ZHANG Jun-guang², GAO Feng^{1,3*}, FANG Bai-ping⁴, CHEN Jing-yi⁴

(1. College of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China;

2. College of Biotechnology, Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

3. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

4. Crop Institute, Academy of Agricultural Sciences of Guangdong, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The virus infection in 14 strains or cultivars of purple sweet potato from Japan was surveyed by the method of enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA) and symptomatology. The results of NCM-ELISA showed that all of strains or cultivars of purple sweet potato were infected by one or more of the following viruses: sweet potato feather mottled virus (SPFMV), sweet potato mild mottled virus (SPMV), sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), sweet potato latent virus (SPLV), C-6 and C-8, in which; the strains or cultivars of A4, A5 and "Shanchuanzi" were infected by the six viruses mentioned above. Meanwhile, the results of symptomatology showed that the major symptoms in leaves of purple sweet potato infected by virus were four types: chlorotic fleck, deformation, necrosis and changing color.

Key words: Purple sweet potato; Virus-detection; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Symptom

甘薯(*Ipomoea batatas* Lam.)为旋花科 1 年生蔓生性草本植物^[1], 是一种重要的粮食、饲料和工业原料作物, 其分布和用途十分广泛。我国是甘薯

生产大国, 甘薯种植面积和产量均占世界的 80% 左右, 居世界首位^[2]。紫色甘薯是日本于 20 世纪 90 年代培育成功的一种高花青素含量的新品种(系),

收稿日期: 2004-10-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B20101014)

作者简介: 杨贤松(1972-), 男, 安徽宿松人, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: yangxs@swnu.edu.cn

通讯作者: 高峰(1962-), 男, 四川成都人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物遗传及分子生物学方面的研究。

E-mail: peak_0041@sina.com.

因部呈深紫色, 俗称“黑红薯”。从紫色甘薯中浸提出来的紫色素是一种天然食用色素, 有多种营养、药理和保健功能, 市场需求非常大。因此, 紫色甘薯的综合开发利用具有十分广泛的应用前景和巨大的经济效益。

由于甘薯以薯块进行无性繁殖, 我国甘薯栽培者又有自留种薯和出售种蔓的习惯, 因此, 极易造成甘薯病毒病的积累和蔓延。甘薯感染病毒病后, 可造成产量降低、品质下降、种性退化, 甚至丧失种植的价值。国内外的研究表明, 甘薯病毒病已成为提高甘薯产量的重要限制因素之一。我国因甘薯病毒病而造成的减产平均达 29.4%^[3]。如何有效地引进外来优良品种或品系, 同时又防止甘薯病毒病在引种和栽培过程中传播和蔓延, 对于甘薯的安全生产和可持续发展是十分重要的。为此, 利用以抗原—抗体特异性结合为基础的 ELISA^[4] 技术, 对从日本引进的一些紫色甘薯品种或品系进行了病毒学检测, 旨在了解其病毒感染状况, 为进一步开发和利用提供參考。

1 材料和方法

1.1 材料

共 20 个甘薯品系(或品种), 见表 1。其中, 从日本引进的 14 个紫色甘薯品系(或品种)是西南师范大学甘薯研究中心李坤培研究员于 1999 年从日

表 1 试验材料

品种(系)名称	采样地	来源	类别
A1	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A2	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A3	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A4	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A5	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A6	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
A7	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B1	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B2	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B3	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B7	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B8	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
B9	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
山川紫	华南师大生物园	日本	紫色甘薯
夏引 1 号	广东农科院大棚	美国夏威夷	紫色甘薯
济薯 18	广东农科院大棚	山东	紫色甘薯
徐薯 18	广东农科院大棚	江苏徐州	常规甘薯
广薯 128	广东农科院大棚	广东	常规甘薯
胭脂薯	广东农科院大棚	广东	常规甘薯
州农 13	广东农科院大棚	广东	常规甘薯

本引入重庆, 2003 年再从重庆引入广东。

酶联免疫检测试剂盒购自山东省农业科学院高新技术研究中心。试剂盒内有下列病毒的血清: (1) 甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV); (2) 甘薯轻度斑驳花叶病毒 (SPMMV); (3) 甘薯褪绿斑点病毒 (SPCFV); (4) 甘薯潜隐病毒 (SPLV); (5) C-6 病毒; (6) C-8 病毒。

1.2 方法

1.2.1 症状观察 2004 年 4 月下旬对种植于华南师范大学生物园内的从日本引进的紫色甘薯进行观察, 目测其叶片上的病毒病症状并记录观察结果。

1.2.2 ELISA 检测

1.2.2.1 检测方法 利用硝化纤维素膜来支持血清反应的酶联免疫吸附检测法 (NCM-ELISA)。操作步骤按酶联免疫检测试剂盒说明书进行。

试验于 2004 年 4 月 14~18 日, 在华南师范大学广东省植物发育生物工程重点实验室进行。空白对照加样品汁液提取缓冲液, 阳性对照和阴性对照分别为广东省农业科学院作物所甘薯室提供并经鉴定已感染病毒和未感染病毒的试管苗样品。

1.2.2.2 记录与分析 观察显色结果, 与空白及阴性、阳性对照比较, 判定反应结果。每个样品均重复试验 2 次, 若二者均为阳性则记为阳性, 二者均为阴性则记为阴性, 一个阳性另一个阴性则记为不能确定。若 ELISA 检测结果呈阳性, 则认为感染了病毒, 从而计算出紫色甘薯的病毒感染率。

紫色甘薯的病毒感染率 = (阳性紫色甘薯植株总数/被检测紫色甘薯植株总数) × 100%

2 结果和分析

2.1 日本紫色甘薯病毒病表现症状

由表 2 可以看出, 所有引进的日本紫色甘薯品系(种)均出现了卷叶或既卷叶又皱缩等叶片畸形症状; A1~A5、B1、B2、B7~B9 和山川紫等 11 个品系(种)的叶片出现了褪绿斑病毒病症状, A6、A7 和 B3 等 3 个品系无此症状; A1~A5 和 B7 等 6 个品系出现了叶片黄化症状, A6、A7、B1~B3、B8、B9 和山川紫等 8 个品系(种)的叶片尚未出现变色症状; A1、A2、A4、A5、A7、B1~B3 和 B7~B9 等 11 个品系的叶片出现枯斑坏死症状, A3、A6 和山川紫等 3 个品系(种)无此症状。

从表 2 还可以看出, A6 叶片表现症状类型数最少, 仅叶片畸形 1 种; A7、B3 和山川紫等 3 个品系(种)的叶片出现了 2 种病毒病症状类型; A3、B1、

表 2 日本紫色甘薯病毒病症状

品种 (系)	叶片症状类型				表现症状类型数 (种)
	斑点斑驳型	畸形型	变色型	枯斑坏死型	
A1	褪绿斑	卷叶、皱缩	叶片黄化	坏死	4
A2	褪绿斑	卷叶	叶片黄化	坏死	4
A3	褪绿斑	卷叶	叶片黄化	无症状	3
A4	褪绿斑	卷叶、皱缩	叶片黄化	坏死	4
A5	褪绿斑	卷叶、皱缩	叶片黄化	坏死	4
A6	无症状	卷叶、皱缩	无症状	无症状	1
A7	无症状	卷叶	无症状	坏死	2
B1	褪绿斑	卷叶、皱缩	无症状	坏死	3
B2	褪绿斑	卷叶	无症状	坏死	3
B3	无症状	卷叶、皱缩	无症状	坏死	2
B7	褪绿斑	卷叶、皱缩	叶片黄化	坏死	4
B8	褪绿斑	卷叶、皱缩	无症状	坏死	3
B9	褪绿斑	卷叶、皱缩	无症状	坏死	3
山川紫	褪绿斑、黄斑	卷叶、皱缩	无症状	无症状	2

B2、B8 和 B9 等 5 个品系的叶片出现了 3 种病毒病症状类型; 叶片表现症状类型数最多的品系为 A1、A2、A4、A5 和 B7, 出现了 4 种病毒病症状类型。

2.2 日本紫色甘薯病毒病的 ELISA 检测结果

检测结果见表 3。从表 3 可以看出, 在 6 种病毒中, SPFMV、SPMMV 在紫色甘薯中感染最广泛, 所有供试紫色甘薯品系(种)均感染了这 2 种病毒; 其次为 SPCFV 和 SPLV, 在紫色甘薯中感染也很普遍, 在 14 个紫色甘薯品系(种)中, 只有 A2 和 B8 两个品系没有感染 SPCFV, A3、A4、B3 等 3 个品系尚不能确定是否感染 SPCFV。A2、B2 和 B8 等 3 个品系未感染 SPLV, A4 不能确定是否感染 SPLV; 被 C—6 病毒和 C—8 病毒感染的紫色甘薯品系(种)最

表 3 日本紫色甘薯病毒检测结果

品种 (系)	病毒种类					
	SPFMV	SPMMV	SPCFV	SPLV	C—6	C—8
A1	+	+	+	+	—	—
A2	+	+	—	—	—	—
A3	+	++	+/-	+	—	—
A4	+	+	+/-	+/-	+	+
A5	++	++	++	++	+	+
A6	++	++	++	++	—	—
A7	+	++	+	+	—	+/-
B1	+	+	++	+	—	—
B2	+	+	+	—	—	—
B3	+	+	+/-	+	—	—
B7	+	+	+	++	+/-	—
B8	+	+	—	—	—	+
B9	+	++	+	++	—	—
山川紫	++	+++	++	+	++	++

注: “+”, “++”, “+++”表示呈阳性反应, 并且 ELISA 显色依次加深, “—”表示呈阴性反应, “+/-”表示不能确定

少, 只有 A4、A5 和山川紫等 3 个品系(种)感染了 C—6 病毒, B7 不能确定是否感染 C—6 病毒。A4、A5、B8 和山川紫等 4 个品系(种)感染了 C—8 病毒, A7 不能确定是否感染 C—8 病毒。

从表 3 还可以看出, 在供试的 14 个日本紫色甘薯品系(种)中, A4、A5 和山川紫等 3 个品系(种)感染上述全部 6 种病毒, 其余 11 个甘薯品系只是感染了其中几种病毒。

2.3 症状诊断法与 ELISA 检测法的比较

分别用症状诊断法和 ELISA 检测法对山川紫、夏引 1 号、济薯 18、徐薯 18、广薯 128、胭脂薯和州农 13 等 7 个甘薯品种进行病毒检测, 结果见表 4。从表 4 可以看出, 7 个甘薯品种中只有山川紫的叶片表现为病毒感染症状, 其余 6 个品种叶片均无病毒感染症状; 而 ELISA 检测结果则表明有 6 个甘薯品种感染了 SPFMV, 5 个甘薯品种感染了 SPM—MV、SPCFV 和 SPLV 等 3 种病毒, 1 个甘薯品种感染了 C—6 病毒和 C—8 病毒。由此可以看出, ELISA 检测法比症状诊断法具有更高的灵敏度。

2.4 日本紫色甘薯品系病毒病的感染结果

从上述试验结果可以看出, ELISA 检测法比症状诊断法具有更高的灵敏度。因此, 以 ELISA 检测法的检测结果为指标, 对 14 个日本引进的紫色甘薯的病毒感染率进行了统计和分析(表 5)。分析结果表明, 从日本引进的紫色甘薯品系感染了 SPFMV 等 6 种甘薯病毒。其中, 所检测的日本紫色甘薯样品均被 SPFMV 和 SPMMV 感染, C—6 病毒的感染率最低, 为 28.6%。由此可以看出, 这些从日本引入重庆已种植 4 至 5 年的紫色甘薯品系感染甘薯病毒病的频率较高。

表 4 症状诊断法与 ELISA 检测法的比较

品种	症状诊断法	ELISA 检测法					
		SPFMV	SPMMV	SPCFV	SPLV	C-6	C-8
山川紫	+	+	+	+	+	+	+
夏引 1 号	—	+	+	+	+	—	—
济薯 18	—	+	+	+	+	—	—
徐薯 18	—	+	+	—	—	—	—
广薯 128	—	+	+	+	+	—	—
胭脂薯	—	+	—	+	+	—	—
州农 13	—	—	—	—	—	—	—

注:“+”表示感染,“—”表示未感染

表 5 日本紫色甘薯的病毒感染率

显色程度	病毒感染率(%)					
	SPFMV	SPMMV	SPCFV	SPLV	C-6	C-8
+++	0	7.1	0	0	0	0
++	21.4	35.8	28.6	28.6	7.1	7.1
+	78.6	57.1	35.7	42.9	14.4	21.4
+/-	0	0	21.4	7.1	7.1	7.1
—	0	0	14.3	21.4	71.4	64.4
总感染率(%)	100	100	85.7	78.6	28.6	35.6

3 讨论

20 世纪 70 年代末,有关甘薯病毒病已有大量的报道。在美洲和非洲,病毒病造成的甘薯减产达 20%~57%^[5]。至 80 年代末,已鉴定出可侵染甘薯的病毒和类病毒种类已达 14 种^[6]。其中,甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)是目前甘薯上研究较为清楚的一种病毒,对甘薯的危害最重,分布最广,全世界甘薯产区普遍发生,几乎在所有种植的品种上都可发现。该病毒可通过汁液、薯块和薯苗营养繁殖体传播,也可通过介体昆虫如棉蚜(*Aphis gossypii*)、豆蚜(*Aphis craccivora*)、萝卜蚜(*Lipaphis erysimi*)和桃蚜(*Myzus persicae*)进行非持续方式传播^[7]。研究表明,引起我国甘薯病毒病的病原主要是甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、褪绿斑驳病毒(SPCFV)和甘薯潜隐病毒(SPLV)。本试验表明,甘薯中感染最普遍的病毒是 SPFMV 和 SPMMV,其次是 SPCFV 和 SPLV,C-6 和 C-8 则感染较少。

常见的甘薯病毒病症状有 4 种类型^[8]:(1)叶片表现斑点斑驳型,包括明脉、褪绿斑点、脉带、紫斑点、紫环斑、黄斑、羽状斑驳和斑驳花叶等。(2)叶片畸形,包括卷叶、皱缩、疱斑、蕨叶、鸡爪叶等。(3)叶片枯斑坏死型,该症状往往同褪绿斑、紫斑、紫环斑同株出现。发病初期为半透明褪绿斑点,以后点周围变成紫褐色并形成紫环斑,最后中心枯死。(4)叶片变色型,主要有黄化、网状黄脉等。甘薯叶片带斑

点和花叶是甘薯病毒病的主要病症,其次为卷叶和皱叶,再次为老叶羽状花叶锈斑和环斑^[5]。本试验表明,卷叶和皱叶是甘薯病毒病的主要病症,其次为叶片带斑点和叶片枯斑坏死,再次为叶片黄化。这与前人的研究结果基本一致。

症状诊断法在实践中虽然方便、实用,但是,病毒病的症状可因病毒种类、甘薯品种以及环境条件等因素的影响而改变^[9],因此,仅仅通过症状来诊断甘薯是否感染病毒是不够确切的,而且,根据症状只能初步判断是否感染了病毒,至于感染病毒的种类则无法区分。NCM-ELISA 检测法是目前使用较广泛和较为可行的方法,该方法根据在硝酸纤维素膜上是否形成有色斑点来判断样品中有无相应的免疫反应,通过所设的阳性、阴性对照来确定哪种颜色程度为阳性反应。采用该方法可快速地检测大量的样品,对样品中含有的极少量病毒也可检测出来。而且 ELISA 检测结果不仅能够确定是否感染病毒,而且能够区分病毒的种类。本试验表明,在供试的 7 个甘薯品种中,症状诊断法只鉴定出一个品种感染了病毒,而 ELISA 检测法则鉴定有 6 个品种感染了 SPFMV 等 6 种病毒。显然,ELISA 检测法比症状诊断法具有更高的灵敏度。

由于甘薯以薯块进行无性繁殖,栽种时间越长,病毒在植株体内积累越多,用传统的指示植物嫁接法进行检测,存在周期长,难以在短时间内获得病毒检测结果。然而,ELISA 技术具有特异性强、灵敏度高、操作简便、易于观察、安全、快速、适合于大规模检测等优点,非常适用于无性繁殖作物病毒病的普查和快速检测。赵红等^[10]认为,将巴西牵牛嫁接法与 ELISA 检测法 2 种方法结合进行检测,能取得更可靠、简便的结果。因此,在以后的病毒检测中,可根据不同的试验要求和目的,采用不同的甘薯病毒病检测方法。

为了防止甘薯病毒病在广大甘薯产区大量发

2004 年河南省小麦病虫害发生状况及原因浅析

吕印谱, 张国彦, 王 丽, 王建敏
(河南省植保植检站, 河南 郑州 450002)

摘要:总结了 2004 年河南省小麦病虫害发生为害的状况、特点及原因。特别是对在河南省小麦条锈病发病中心普遍、外来菌源充足以及蚜虫大量发生的条件下, 采取有力措施、充分发动广大农民群众、积极开展综合防治工作、最大限度减少损失的原因进行了分析, 为今后进一步搞好小麦病虫害的综合治理提供了经验。同时, 提出了 2005 年小麦病虫害发生趋势、治理策略及措施。

关键词:小麦; 病虫害; 发生; 原因

中图分类号:S435.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1004—3268(2005)02—0038—04

1 小麦病、虫害发生状况

从整体上看, 2004 年, 河南省小麦病虫害是一个中度发生年份, 全省小麦各种病虫害累计发生总面积 1 840 万 hm^2 , 其中: 小麦病害累计发生面积 840 万 hm^2 , 虫害累计发生面积 1 000 万 hm^2 。发生为害的主要特点: 一是发生面积大, 造成损失小。二是虫害重于病害。病害轻于 2003 年, 虫害重于

2003 年。三是冬前基数小, 春季虫害发生早, 病害盛期晚。

1.1 主要病害

2004 年, 我省小麦病害累计发生面积 840 万 hm^2 。主要病害中度或偏轻发生, 其中, 条锈病、赤霉病等暴发性病害轻于 2003 年, 而重于常年, 叶锈病、黑穗病和全蚀病重于 2003 年, 其他病害轻于 2003 年。

收稿日期: 2004—10—27
作者简介: 吕印谱(1957—), 男, 河南新乡人, 研究员, 在读博士, 主要从事植物保护技术推广和研究工作。Tel: 0371—3949048

生, 采取切实有效的防治措施显得尤为重要。通常情况下, 简便、有效的控制农作物细菌和真菌病害的手段是施用农药, 而对于甘薯病毒病则只能用预防的方法加以控制。目前, 用于控制甘薯病毒病的主要方法有 2 种: 生产健康种薯和培育抗(耐)病毒的栽培品种。其中, 生产健康种薯是普遍采用的一种有效防治方法, 它通过无毒原种的增殖并筛选大量的无性后代来获得足够数量的无毒种薯或种苗。目前, 通过茎尖组织培养可以获得甘薯不同品种的脱毒原种, 此方法已成为常规方法。但是, 从长远效应上看, 培育抗(耐)病毒的甘薯新品种是防止病毒感染最经济和最彻底的方法。然而, 在抗病毒病的甘薯品种尚未育成之前, 脱毒薯的应用仍是甘薯生产中一条非常有效的增产途径。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六十四卷 第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 88—90.
[2] 马代夫. 世界甘薯生产现状和发展预测[J]. 世界农业, 2001(1): 17—19.
[3] 李汝刚. 甘薯病毒及类病毒病害[J]. 植物保护, 1992(2): 31—35.
[4] Van Weemen B K, Schuurs A H. Immunoassay using antigen enzyme conjugates[J]. FEBS letters, 1971, 15(2): 232—239.
[5] 宋伯符, 王胜武, 谢开云, 等. 我国甘薯脱毒研究的现状及展望[J]. 中国农业科学, 1996, 30(6): 43—48.
[6] Moyer J W, Larsen R C. Management of inset vectors of viruses infecting sweet potato. Sweet potato Pest Management, A Global Perspective[M]. Westview Press, Oxford IBH Publishing Co Pvt Ltd, 1991. 341—358.
[7] 单林娜, 葛应兰, 李建波, 等. 甘薯病毒病原学研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2001, 5(1): 92—96.
[8] 邢继英, 孙爱根, 杨永嘉. 甘薯种质资源圃病毒病发生情况调查[J]. 作物品种资源, 1998(4): 53—55.
[9] 张振臣, 乔奇, 靳秀兰, 等. 甘薯脱毒苗检测技术[J]. 河南农业科学, 1999(4): 10—11.
[10] 赵红, 江茂斌, 朱玉灵, 等. 皖北甘薯主栽品种病毒病的检测[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(2): 156—157.