

魏 瑶,刘 燕,图门白拉,等. 内蒙古自治区马铃薯病毒病的检测[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):111-115.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.020

内蒙古自治区马铃薯病毒病的检测

魏 瑶¹, 刘 燕², 图门白拉¹, 赵明敏¹

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 内蒙古呼和浩特 010019; 2. 内蒙古包头市农牧业科学研究院, 内蒙古包头 014013)

摘要:马铃薯病毒病是我国马铃薯作物常见病害之一,是影响马铃薯生产的重要因子。内蒙古自治区是我国最大的马铃薯种植区。目前,内蒙古自治区引起马铃薯病毒病的病原种类尚不清楚。利用反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,简称 RT-PCR)技术对内蒙古自治区马铃薯主要种植产区几种常见的病毒病进行检测。结果表明,在 27 份样品中有 11 份样品为复合侵染,15 份为单独侵染。其中,6 个样品为马铃薯 Y 病毒(potato virus Y,简称 PVY)和马铃薯卷叶病毒(potato leaf roll virus,简称 PLRV)的复合侵染;2 份样品为 PVY 和马铃薯 M 病毒(potato virus M,简称 PVM)的复合侵染;1 份样品为 PVY、PLRV 和马铃薯 S 病毒(potato virus S,简称 PVS)的复合侵染;1 份样品为 PVY、PLRV 和 PVM 的复合侵染;1 份样品为 PVY、PLRV、PVM 和马铃薯 A 病毒(potato virus A,简称 PVA)的复合侵染。15 份单独侵染的样品中均检测到 PVY。27 份样品中均未检测到马铃薯 X 病毒(potato virus X,简称 PVX)。由此可见,无论复合侵染还是单独侵染均检测到 PVY。说明 PVY 是引起当地马铃薯病毒病的主要病原之一。

关键词:马铃薯病毒病;反转录-聚合酶链式反应;植物病毒检测

中图分类号:S435.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)08-0111-05

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)原产于南美洲安第斯山地区^[1],属于一年生茄科茄属作物,是世界第四大粮食作物,具有很高的营养价值和商品价值。马铃薯病毒病是导致马铃薯退化的根本原因,被病毒侵染后一般减产 20%~50%,严重的达 80%^[2],病毒病长期以来是制约马铃薯生产的重要因素。目前,尽管生产上多采用的脱毒种薯能够在一定程度上减轻病毒病的危害,但生长中后期田间的病毒再次侵染也可导致产量的大幅度降低。因此,无论在脱毒种薯生产,还是大田栽培中,马铃薯病毒病的检测对保证马铃薯稳产、高产至关重要。目前,已报道的感染马铃薯的病毒多达 35 种以上,其中危害严重的有 6~7 种,包括马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(potato leaf roll virus, PLRV)、马铃薯 M 病毒(potato virus M, PVM)、马铃薯 S 病毒(potato virus S, PVS)、马铃薯

A 病毒(potato virus A, 简称 PVA)、马铃薯 X 病毒(potato virus X, 简称 PVX)等。随着病毒检测技术的发展,发现几乎所有的马铃薯品种均受到一种或几种病毒的复合侵染^[3]。黄遵锡等对田间几种较严重的病毒病害进行了免疫电镜鉴定,分别观察到 PVX、PVY、烟草花叶病毒(TMV)、烟草蚀纹病毒(TEV)病毒粒体及其上的套环结构^[4]。分子生物学检测技术从核酸水平检测植物病毒,灵敏度高、特异性强,能克服血清学及其他检测方法中的缺点,可以进行大批量的样本检测,是目前发展最快、最有发展前景的病毒检测技术^[5]。反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, 简称 RT-PCR)检测快速、灵敏度高、特异性强,在病毒检测中越来越显示出强大的优势,在马铃薯病毒检测中应用广泛^[6]。

本研究利用 RT-PCR 技术对内蒙古自治区马铃薯主要种植产区 6 种病毒病进行检测。研究结果可为马铃薯脱毒种薯生产过程中病毒病的检测以及马铃薯病毒病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018 年在内蒙古呼和浩特市、乌兰察布市等地

收稿日期:2019-09-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31770165);内蒙古农业大学高层次人才引进科研启动项目(编号:NDGCC2016-23)。

作者简介:魏 瑶(1996—),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,主要从事马铃薯病毒病的研究。E-mail:weiyao2018@163.com。

通信作者:赵明敏,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病毒学的教学和科研工作。E-mail:mingminzh@163.com。

区采集疑似马铃薯病毒病病株叶片,共 27 份(表 1),液氮速冻后保存于 -80 ℃超低温冰箱中备用。

表 1 供试马铃薯样品

采样地点	采样时间	样品数 (份)
内蒙古呼和浩特市武川县哈乐镇	2018 年 7 月	14
内蒙古乌兰察布市中加农业生物科技有限公司试验田	2018 年 7 月	4
内蒙古呼和浩特市内蒙古农业大学教学农场	2018 年 7 月	9

1.1.1 主要试剂和仪器 主要试剂有 TRIzol RNA 提取试剂、DNA Marker、6 × DNA loading buffer,均购自天根生化科技(北京)有限公司;随机引物、反转录试剂、PCR mix,均购自 Promega 公司;rTaq 酶、10 × PCR buffer、2.5 mmol/L dNTP,均购自 TaKaRa 公司。

主要仪器包括 Eppendorf 移液器、BIO - RAD My Cyclcr PCR 仪、BIO - RAD 凝胶成像系统等。

1.1.2 引物的设计与合成 根据文献报道相应病毒基因序列设计引物(表 2),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 用于检测 6 种病毒的引物序列

病毒	上游引物 - F(5' ~ 3')	下游引物 - R(5' ~ 3')	目标片段 (bp)	退火温度 (℃)
PVY	GGCATACGGACATAGGAGAAACT	CTCTCTGTGTTCTCCTCTTGCTGT	456	65
PLRV	ATGAGTACGGTCGTGGTTAA	CTATTTGGGGTTTTGCAAAAG	600	53
PVS	TGGGTGATTCAACGAAGAAGCT	GCTTGCGACCTTGCAAAATAGC	642	63
PVA	CATGTTGGTTATGAGCTTGATG	CCAGGCTATCTTGCTTACACTG	501	59
PVM	ATGCACTCGTGGGACTGTG	CAGTACTCCCATCAGTGTCT	339	57
PVX	ATGTCAGCACCAGCTAGCAC	GGATCCTTATGCTGGTGCTAG	720	59

1.2 试验方法

1.2.1 植物总 RNA 提取 以感染马铃薯病毒病植株的叶片和健康叶片为试验材料,称取 0.1 g 植物组织,采用 TRIzol 法提取植物总 RNA。

1.2.2 RT - PCR 检测 反转录体系:以提取的总 RNA 为模板,用 Promega 试剂盒,合成第 1 条链,反应体系在 0.2 mL 的 PCR 管中进行,依次加入 0.5 μL Random primers、1 μg RNA,用 Nuclease - Free Water 补足至 5 μL,混匀,在 65 ℃ PCR 仪中温育 5 min;之后加 4 μL 5 × Reaction buffer,3.8 μL MgCl₂,1 μL PCR Nucleotide Mix,0.5 μL Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor,1 μL Reverse Transcriptase,4.7 μL Nuclease - Free Water;混匀,在 PCR 仪中 25 ℃、5 min,37 ℃、1 h,70 ℃、15 min 合成 cDNA,直接进行 PCR 扩增或置于 -20 ℃冰箱中保存。

PCR 扩增程序与凝胶电泳:根据不同引物调整退火温度,主要采用以下 PCR 扩增程序:在 25 μL 反应体系中,加入 2 μL cDNA,1 μL 引物 - F,1 μL

引物 - R,0.5 μL rTaq 酶,2.5 μL 10 × PCR buffer,2 μL 2.5 mmol/L dNTP,16 μL dd H₂O,反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,Tm(不同引物的退火温度)退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 3 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖进行凝胶电泳,在凝胶成像仪上检测并照相。

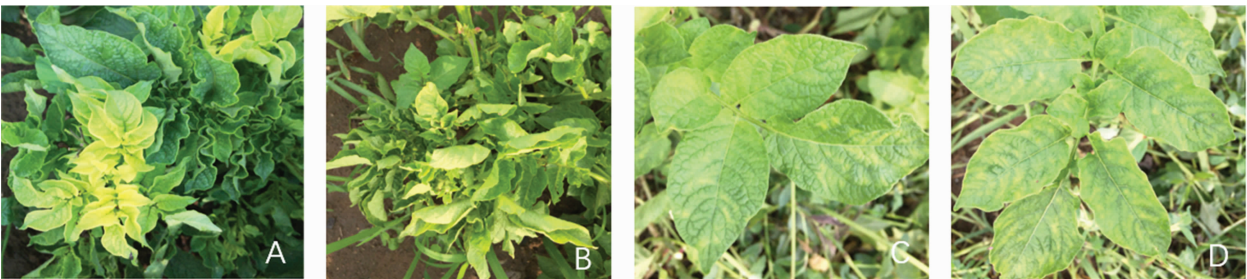
1.2.3 PCR 产物测序及分析 将扩增出 PVY 特异性条带的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

用 MEGA 6.0 进行相关序列系统进化树分析,采用相邻法(neighbor - joining,简称 NJ)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 马铃薯病毒病发病症状

在内蒙古农业大学教学农场马铃薯田、内蒙古呼和浩特市武川县哈乐镇和内蒙古乌兰察布市中加农业生物科技有限公司的试验田进行采样。马铃薯植株症状表现有花叶、卷叶、矮化、变色等症状(图 1)。



A—矮化、变色、卷叶；B—卷叶；C、D 均为花叶

图1 马铃薯病毒病发病症状

2.2 RT-PCR 检测结果

对 27 个样品进行提取总 RNA 后,获得 cDNA,以 cDNA 为模板,用引物 - F 和引物 - R 进行 PCR 扩增,结果(表 3、图 2)显示,在 27 份样品中,11 份样品为复合侵染,15 份为单独侵染,而第 11 号样品未检测到病毒侵染情况。其中,6 份样品为 PVY 和 PLRV 的复合侵染;2 份样品为 PVY 和 PVM 的复合

侵染;1 份样品为 PVY、PLRV 和 PVS 的复合侵染;1 份样品为 PVY、PLRV 和 PVM 的复合侵染;1 份样品为 PVY、PLRV、PVM 和 PVA 的复合侵染。15 份单独侵染的样品中均检测到 PVY。27 份样品中均未检测到 PVX。由此可见,无论复合侵染还是单独侵染均检测到了 PVY。说明 PVY 是引起当地马铃薯病毒病的主要病原之一。

表 3 马铃薯病毒病的 RT-PCR 检测结果

检测病毒	各样点样品的 RT-PCR 检测结果																										
	武川县哈乐镇												中加公司试验田						内蒙古农业大学教学农场								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
PVY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PLRV	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
PVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PVA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PVM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
PVX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”表示检测到特异性扩增,“-”表示未检测到特异性扩增。

2.3 进化树分析

为进一步分析 PVY 与已报道的序列的一致性,对 1~18 号中有特异性扩增的 17 个样品进行测序(其中,13 号样品测序时显示不合格,测序失败)。将测序结果与 GenBank 中已登录的 PVY 序列进行比对,构建进化树,以李痘病毒分离物 AnMrPI533(MG 686954)作为外参。结果(图 3)表明,所扩增获得的 PVY 片段的序列与 GenBank 中已登录的 PVY 序列相似性很高,其中 Y-H-6 和 Y-H-7 样品在同一分支上,Y-H-3 和 Y-H-8 样品在同一分支上,他们的亲缘关系最近;Y-H-2 样品与 PVY-Jessore(MF589764)亲缘关系较近。

2.4 序列一致性分析

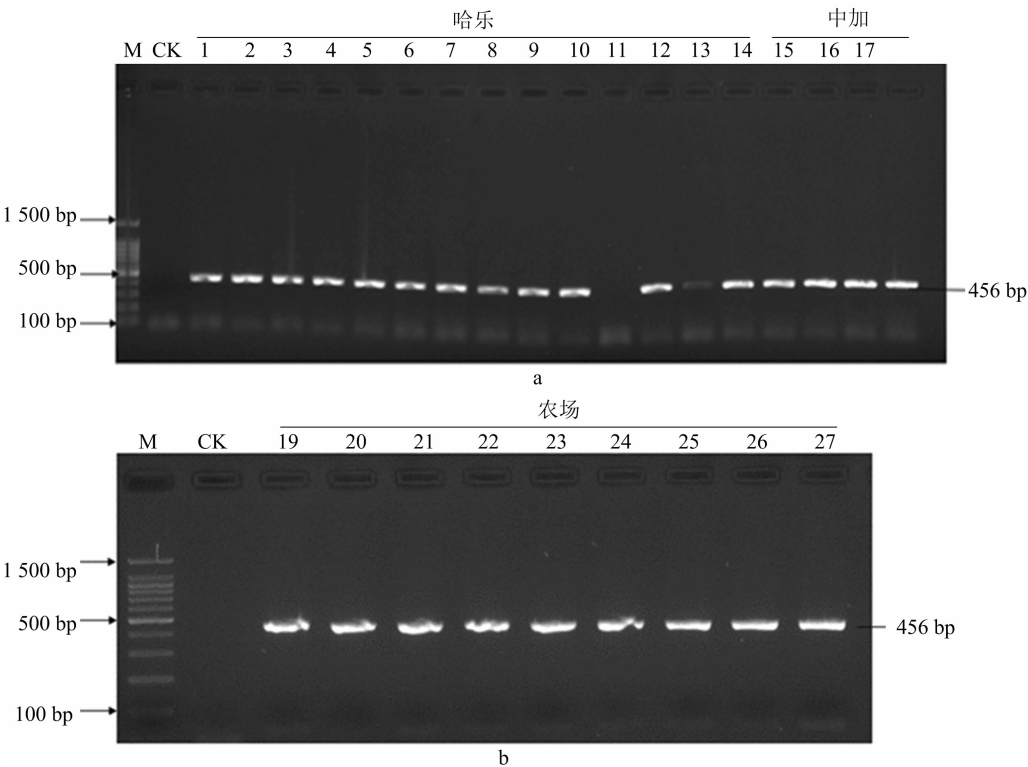
应用 SDTv. 1.0 软件分析 PVY 测序序列与 GenBank 中已登录的 PVY 序列核酸一致性(图 4),以李痘病毒分离物 AnMrPI533(MG 686954)作为外

参。结果表明,16 个样品测序序列与 GenBank 中已登录的 PVY 序列的一致性达到 95% 以上。

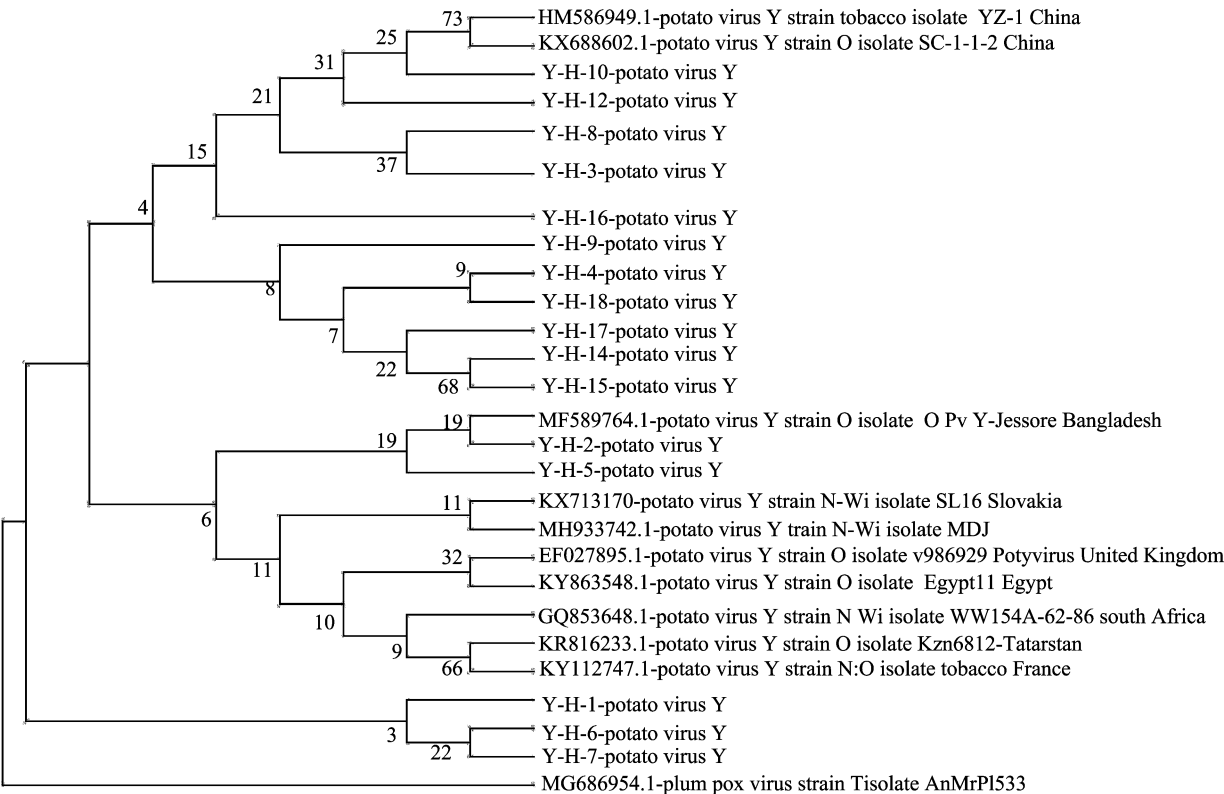
3 讨论

马铃薯病毒病是我国马铃薯作物重要病害之一,是制约马铃薯产业发展的一大难题。目前,生产上脱毒种薯的广泛应用虽然能够在一定程度上解决马铃薯种薯退化问题,但脱毒种薯质量和大田生产中病毒病的再侵染仍是马铃薯生产中尚待解决的首要问题。为进一步明确内蒙古自治区马铃薯病毒病的病原是由哪些病毒组成的,本试验利用 RT-PCR 技术在内蒙古自治区马铃薯主要种植产区进行了采样和 6 种病毒病的检测研究。

秦亚南曾在内蒙古呼和浩特市周边 6 个旗县(清水河县、察右中旗、四子王旗、和林县、卓资县、武川县)进行马铃薯病毒检测,通过 PCR 法检测了 PVX、



M 为 DNA marker; CK 为健康植株对照; 1~27 为表 3 中对应的 27 份样品
图2 PVY 的 RT-PCR 检测结果



Y-H-1~Y-H-18 与表 3 中 1~18 号样品相对应。下图同
图3 在 PVY 测序序列基础上构建的进化树

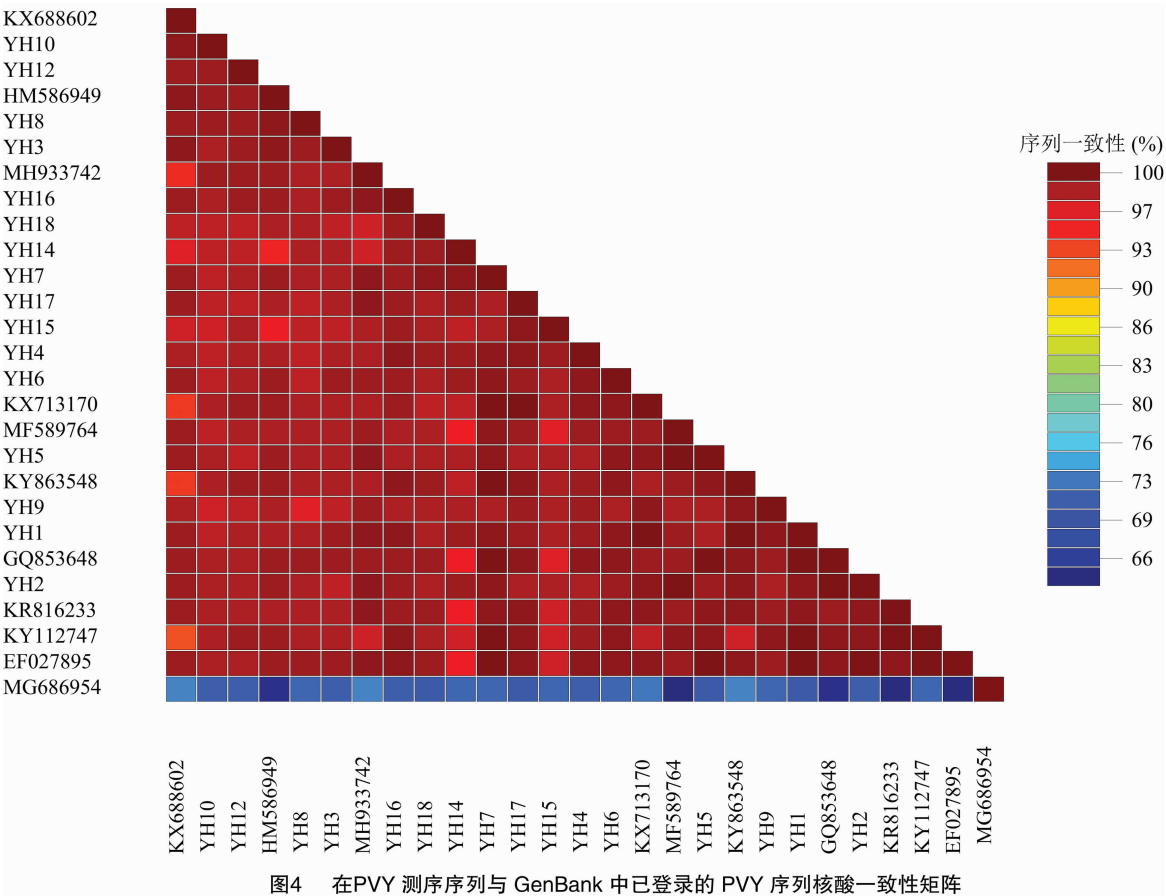


图4 在PVY 测序序列与 GenBank 中已登录的 PVY 序列核酸一致性矩阵

PVY、PLRV、PVA、PVS、PVM、马铃薯帚顶病毒 (potato mop – top virus,简称 PMTV)7 个病毒^[7]。结果表明,6 个地区的病叶样品中均能检测到 PVY,且检出率较高,为 85.6%。PVX、PLRV 总检出率分别为 4.8%、26.4%。PVA、PVM、PVS 总检出率分别为 12.0%、1.6%、24.8%。PMTV 在 6 个地区的样品中检出率为 0。董代幸在新疆马铃薯种薯、商品薯的重要生产基地乌鲁木齐检测马铃薯病毒,结果表明侵染乌鲁木齐地区马铃薯的主要病原病毒有 PVX、PVY、PVA、PLRV,类病毒为马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)^[8]。其中 PVY、PLRV 的侵染率最高,其次为 PVX、PVA,PSTVd 的侵染率较低。颜谦等调查贵州省不同海拔地区马铃薯病害发生情况,结果表明,危害贵州省马铃薯较重的病毒种类依次为 PVS、PVY、PVX、PLRV^[9]。

与已有研究结果相似,本研究发现在内蒙古自治区的马铃薯病毒病主要是 PVY 与其他几种病毒如 PLRV、PVM、PVS、PVA 的混合侵染。在供试样品中未检测到 PVX 病毒。

很多学者的报道中显示,无论在脱毒种薯还是大田植株上都很难检测到 PVS 病毒。但本研究在

内蒙古农业大学教学农场的 25 号样品中检测到了 PVS 病毒。

参考文献:

[1]Salazar L F. 马铃薯病毒及其防治北京[M]. 阎文昭,译. 北京:中国农业技术出版社,2000.

[2]钟婷婷. 马铃薯病毒病 RT – PCR 检测体系的建立及病毒病在四川省的种类与分布[D]. 雅安:四川农业大学,2007.

[3]Salazar L F . Potato viruses and their control[M]. Lima:International Potato Center,1996.

[4]黄遵锡,李 红,陈文久,等. 引起烟草严重病害的五种病毒的酶联免疫及免疫电泳鉴定[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),1997,17(1):75 – 81.

[5]董代幸,张祥林,罗 明,等. 马铃薯病毒一步法多重 RT – PCR 检测技术的构建[J]. 微生物学通报,2011,38(1):131 – 137.

[6]吴兴泉,时 妍,杨庆东,等. 马铃薯病毒的 RT – PCR 检测技术评述[J]. 中国马铃薯,2011,25(4):251 – 254.

[7]秦亚南. 呼和浩特周边地区马铃薯病毒病的田间调查及分子鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2018.

[8]董代幸. 乌鲁木齐地区马铃薯病毒和类病毒的分子鉴定及检测技术研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.

[9]颜 谦,黄 萍,宋吉轩,等. 贵州不同海拔地区马铃薯病毒病初步调查及检测鉴定[J]. 安徽农业科学,2009,37(29):14262 – 14263.