

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2023)01-0036-09

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2023.01.005

不同品种(系)马铃薯休眠块茎顶端和茎端芽眼组织 马铃薯Y病毒含量分析

王新新¹, 张 威², 刘尚武², 尚 慧³, 白艳菊², 王彦杰^{4*}

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院/农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163319;

2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030;

4. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)是马铃薯生产中较常见的病毒之一, 马铃薯病毒的检测是生产中保障马铃薯品质和产量的重要基础, 收获后批量检测是进行种薯质量评价的主要依据之一。研究针对‘56-2’‘Ivory Russet’‘Clearwater Russet’‘龙薯14号’‘龙薯3号’‘龙薯15号’‘龙育201401-70’‘龙薯7号’‘克新23号’和‘克新28号’马铃薯品种(系)休眠块茎样品, 采用TRIzol法提取马铃薯休眠块茎顶端和茎端芽眼组织的总RNA, 经qRT-PCR和RT-PCR检测分析, 比较块茎的顶端与茎端芽眼组织PVY含量分布的情况。结果表明, 上述供试材料的休眠块茎茎端芽眼组织PVY浓度均高于顶端芽眼组织, 能够精准的检测到病毒的存在; 对‘Ivory Russet’品种的休眠块茎选取100个带病样品通过TRIzol法提取顶端与茎端的总RNA, 采用4合1的方法合样后进行PVY RT-PCR检测, 所有处理的顶端芽眼组织检测条带亮度低于茎端芽眼组织。可见, 马铃薯休眠块茎茎端芽眼组织取样能够更加精准的检测出PVY。研究结果为马铃薯种薯收获后PVY的检测及合理取样提供了科学依据。

关键词: 马铃薯Y病毒(PVY); 休眠块茎; 部位; 病毒含量

Analysis of Potato Y Virus Content in Bud Eye Tissue of the Dormant Potato Tuber Apical End and Stolon End of Different Potato Varieties (Lines)

WANG Xinxin¹, ZHANG Wei², LIU Shangwu², SHANG Hui³, BAI Yanju², WANG Yanjie^{4*}

(1. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University/Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in

Northeastern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

3. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

4. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: Potato virus Y (PVY) is one of the common viruses in potato production. Detection of potato virus is an important basis for safeguarding potato quality and yield in production. Batch detection after harvest is one of the main

收稿日期: 2023-01-05

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-09-P16); 云南省科学技术厅重大专项(202102AE090018)。

作者简介: 王新新(1996-), 女, 硕士研究生, 从事马铃薯Y病毒防控研究。

*通信作者(Corresponding author): 王彦杰, 博士, 教授, 主要从事农用微生物、农业废弃物资源化利用研究, E-mail: wangyanjie1972@163.com。

bases for seed potato quality evaluation. In this study, dormant tuber samples from the potato varieties (lines) of '56-2', 'Ivory Russet', 'Clearwater Russet', 'Longshu 14', 'Longshu 3', 'Longshu 15', 'Longyu 201401-70', 'Longshu 7', 'Kexin 23' and 'Kexin 28' were used to extract the total RNA in bud eyes tissues of apical end and stolon end by TRIzol method. The distribution of PVY content in bud eyes tissues of the apical end and stolon end was compared by qRT-PCR and RT-PCR detection analysis. The PVY concentration in bud eyes tissues of the stolon end of the tested varieties (lines) was higher than that in the apical end, indicating that the presence of the virus could be accurately detected in stolon end. One hundred diseased tuber samples were selected from the dormant tubers of 'Ivory Russet', and the total RNA in eye tissues of the apical end and stolon end was extracted by TRIzol method. The samples were combined by 4 in 1 method for PVY RT-PCR detection. The band brightness of apical end was lower than that of stolon end in all treatments, indicating that PVY could be detected more accurately using stolon end sample than apical end in dormant tubers. The results of this study provide a scientific basis for the reasonable sampling and detection of PVY after seed potato harvest.

Key Words: potato virus Y; dormant tuber; position; virus content

马铃薯是仅次于水稻、小麦和玉米的第四大粮食作物, 中国马铃薯种植面积稳定每年 533 多万 hm^2 , 位列世界首位^[1], 但其产量和品质受病毒性病害和细菌性病害的危害非常严重^[2], 单产产量仅为世界平均水平的 85% 左右^[3], 其重要因素之一是病毒病积累引起的马铃薯减产^[4]。由于马铃薯通常采用无性块茎繁殖, 所以当马铃薯感染某一病毒或某几种病毒后, 将会逐代传播下去, 导致危害逐年加重。据报道, 感染马铃薯的病毒达 40 种以上, 在中国发生比较普遍的主要有马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS)、马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA)、马铃薯 M 病毒(Potato virus M, PVM)以及马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)^[5]。其中, PVY 和 PLRV 对马铃薯危害比较严重, 被所有的马铃薯种植国家认为是最严重的威胁^[6], 为种薯收获后检测的重点对象。目前, 欧美国家的马铃薯种薯质量认证是维护产业先进性的一个重要措施, 种薯检测和认证是在法律约束下实施的, 中国种薯生产也有对应的国家标准推动种薯生产质量提升^[7]。其中, 马铃薯种薯收获后检测结果是种薯质量检测、认证流程中的一个重要指标, 主要检测的内容除了 PVY 和 PLRV, 还有细菌病害的环腐病、青枯病和软腐病, 其对马铃薯的品质具有严重影响^[8]。因此, 种薯收获后多种病

害同时检测时, 检测效率及检测精准度至关重要。

目前, 马铃薯细菌性病害和病毒病害检测的方法主要有聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)、反转录多聚酶链式反应(Rreverse transcription PCR, RT-PCR)和实时荧光定量 RT-PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)等方法^[9]。魏琪等^[10]建立了马铃薯细菌病害环腐病菌的 qRT-PCR 检测体系。张威等^[11]建立了病毒病害 PVY、PVX、PVS、PLRV、PVM 和 PVS 马铃薯 6 种主要病毒通用的 RT-PCR 检测体系。李玉琦等^[12]研究建立了 PVY 的 qRT-PCR 检测技术体系, 可特异性检测 PVY, 对山东省、青海省、贵州省、黑龙江省和河北省 5 个省份马铃薯植株中的 PVY 进行检测。Bright 等^[13]采用 TaqMan real-time RT-PCR 对马铃薯块茎中的 PLRV、PVY、PVA 和 PVX 进行了检测。当采用 RT-PCR 和 qRT-PCR 的方法检测马铃薯块茎样品中细菌病害和病毒病害时, 不同病害需要分别取样, 细菌病害检测普遍取样的部位是块茎的茎端^[14], 而病毒通常取顶端^[15], 按照国内外马铃薯种薯质量检测标准, 每个种薯批检测的块茎量为 100、200 或 400 个^[7]。如果按照顶端和茎端分别取样的方法, 势必会提高样品量, 同时也会增加运输成本。已有研究发现, 马铃薯块茎不同部位病毒的含量存在差异, Gugerlj 和 Gehriger^[16]应用酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析经过

Rindite处理打破休眠前和打破休眠后不同品种马铃薯块茎不同部位PVY浓度,发现在休眠块茎顶端病毒浓度高于脐部(茎端),并且在打破休眠后PVY浓度迅速增加。本研究为了简化种薯收获后检测的取样步骤和取样量,在前人研究的基础上,进一步分析不同马铃薯品种(系)休眠块茎中不同部位的PVY累积量,以期能找到PVY检测和细菌病害检测时相同的取样部位,使种薯收获后检测更容易操作和推广普及,这对马铃薯种薯质量检测 and 认证工作的开展以及促进产业发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取‘56-2’‘Ivory Russet’‘Clearwater Russet’‘龙薯14号’‘龙薯3号’‘龙薯15号’‘龙育201401-70’‘龙薯7号’‘克新23号’和‘克新28号’马铃薯品种(系)休眠块茎作为qRT-PCR和RT-PCR检测的试验材料。

试验所用马铃薯品种(系)均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。对提供的合样检测结果为阳性的块茎,应用RT-PCR方法分别检测每个块茎的顶端与茎端芽眼组织,最终确定具体感病块茎。每个供试品种(系)中筛选出3个感PVY块茎。合样检测时每个块茎取1/4的芽眼切片,剩余的芽眼组织用于qRT-PCR和RT-PCR对马铃薯休眠块茎不同部位PVY浓度的检测。

批量检测的品种为‘Ivory Russet’,检测时所用的阴性对照和阳性对照样品为黑龙江省农业科学院经济作物研究所马铃薯质检中心保存的无毒块茎和感染PVY的块茎。

1.2 试验试剂和仪器

供试试剂: TRIzol提取液、氯仿、异丙醇和无水乙醇均为国产分析纯。N9随机引物、ddH₂O、RNA酶抑制剂和M-MLV反转录酶、dNTP Mix、Taq Mix, DL-100 Marker购自TaKaRa公司。qRT-PCR使用的rTaq酶购自TaKaRa公司。

供试仪器: 琼脂糖凝胶电泳系统、紫外凝胶成像系统、紫外可见分光光度仪、PCR扩增仪、

低温高速冷冻离心机、罗氏(Roche)生产的Light Cycler 480 II的Real-time PCR仪。

1.3 试验方法

1.3.1 马铃薯样品处理方法

马铃薯合样试验的样品处理方法: 将样品按照合样数量混合研磨,合样比例为1:4^[17],即4合1取样。

马铃薯块茎的处理方法: 顶端和茎端的芽眼检测时,分别取休眠块茎顶端和茎端1/4芽眼,用于PVY检测,剩余的芽眼组织作为qRT-PCR和RT-PCR检测马铃薯休眠块茎不同部位PVY浓度备用样品。

1.3.2 总RNA提取

利用TRIzol法提取马铃薯块茎RNA,操作步骤参考TRIzol使用说明书。

1.3.3 RNA质量检测与定量

采用TRIzol法提取马铃薯休眠块茎总RNA后,利用ND-1000紫外分光光度仪对提取的马铃薯块茎不同组织部位总RNA样品的浓度进行检测,最终上样模板量为500 ng。

1.3.4 RT-PCR反应体系及条件

cDNA合成: 取500 ng RNA、1 μL随机引物、补无DNA/RNA酶去离子水至10 μL体系,70℃预变性5 min,4℃2 min。5×反转录缓冲液5 μL、10 mmol/L dNTP 1.25 μL、RNA酶抑制剂0.5 μL、M-MLV反转录酶1 μL、无DNA/RNA酶去离子水7.25 μL。反转录程序为37℃1 h,70℃15 min,4℃5 min。合成的cDNA保存于-20℃冰箱备用。

RT-PCR反应体系: PVY-F、PVY-R引物各0.5 μL、Taq酶12.5 μL、cDNA 2 μL,用无DNA/RNA酶去离子水补至25 μL。反应程序: 94℃5 min,94℃30 s,55.5℃30 s,72℃45 s,72℃7 min,30个循环。

1.3.5 电泳检测

先用蒸馏水配制电泳缓冲液TAE,将电泳槽、制胶槽与梳子冲洗晾干。取5 μL RNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳,150 V稳压电泳25 min,至溴酚兰迁移到凝胶长度的2/3时停止电泳。紫外

灯下观察结果。

1.3.6 qRT-PCR反应体系及条件

反应体系：模板 cDNA 2 μL ，PVY-1F、PVY-1R 引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)，探针 0.5 μL ，10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL ，Taq DNA 聚合酶 0.20 μL ，dNTPs (2.5 mmol/L) 0.25 μL ，补水至 25 μL 。

反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，45 个循环；97 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。将样品放入 LightCycler[®] 480 荧光定量仪进行 qRT-PCR 扩增。

1.3.7 引物和探针

本研究所用引物见表 1。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.8 qRT-PCR标准曲线建立

本研究所用质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。质粒拷贝数计算公式^[19]：

$$\text{拷贝数}/\mu\text{L} = [(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数/摩尔}) \times (\text{浓度} \times 10^{-9})] / [\text{DNA length (dsDNA)} \times 660]$$

式中：6.02 $\times 10^{23}$ 为阿佛加德罗常数，dsDNA = 碱基数 $\times$ 660 道尔顿/碱基。

本研究中使用的是 pUC57 克隆载体，其碱基对数为 2 751 bp。参考尚慧^[19]方法对重组质粒样品浓度梯度稀释，利用罗氏(Roche)生产的 Light-Cycler 480II Real-time PCR 仪进行 qPCR 反应，反应后的试验结果选取 5 个不同浓度梯度，运用仪器自带软件，生成标准曲线。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段长度(bp) Product length	参考文献 Reference
PVY-F	GGCATACGGACATAGGAGAACT	447	[18]
PVY-R	CTCTCTGTGTCTCTCTTGTGT		
PVY-1F	CCAATCGTTGAGAATGCAAAAC	75	[19]
PVY-1R	ATATACGCTTCTGCAACATCTGAGA		
PVY-1 Probe	5'/FAM/TTAGGCAAATCATGGCACAT/BHQ1/3'		

2 结果与分析

2.1 qRT-PCR检测不同马铃薯品种(系)休眠块茎顶端与茎端芽眼组织PVY含量

PVY 通用的重组质粒的原始拷贝数为 1.18×10^9 个拷贝数(Copies)，经过梯度稀释，将稀释后的重组质粒样品进行 qRT-PCR 反应，反应之后，选取合适的浓度进行标准曲线的制备，最终确定标准品在 $1.18 \times 10^4 \sim 1.18 \times 10^9$ 拷贝/ μL ，测定值基本在一条直线上。得到的标准曲线相应数值分别为：Error: 0.013 5，Efficiency: 1.812，Slope: -3.875 (图 1、2)。该体系线性关系良好， $y = 49.038 - 3.848 4x$ ，决定系数 $R^2 = 0.999 4$ 。对休眠时期的‘56-2’‘Ivory Russet’‘Clearwater Russet’‘龙薯 14 号’‘龙薯 3 号’‘龙薯 15 号’‘龙育 201401-70’‘龙薯 7 号’‘克新 23 号’和‘克新 28 号’马铃薯品种(系)块茎顶端和茎端的芽眼组织样品进行

qRT-PCR 检测，结果见图 3，发现所有供试马铃薯品种(系)茎端芽眼组织病毒浓度均显著高于顶端芽眼组织。

2.2 RT-PCR检测不同马铃薯品种(系)休眠块茎顶端与茎端芽眼组织PVY

对供试的 10 个马铃薯品种(系)的休眠块茎同时采集顶端和茎端的芽眼组织进行 PVY 检测，阴阳质控均为黑龙江省农业科学院经济作物研究所马铃薯质检中心保存的无毒块茎和感染 PVY 的块茎样品，检测结果见图 4 和表 2。图 4 所显示的结果为每个试验品种(系)选取 3 个块茎样品检测，茎端芽眼组织取样均能够检测出病毒；而顶端芽眼组织除了‘56-2’品系的样品 2 及‘克新 23 号’‘克新 28 号’和‘56-2’的样品 3 的病毒检测结果为阴性(表 2)，其他检测样品均为阳性，但茎端芽眼组织电泳条带亮度均高于顶端芽眼组织。说明茎端芽眼组织取样能够更加准确的检测出 PVY。

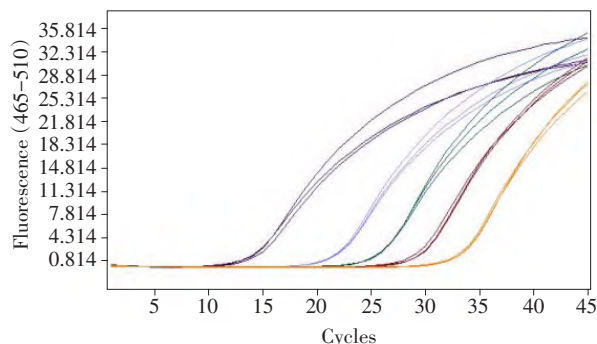


图1 通用PVY扩增曲线

Figure 1 Amplification curve for PVY general

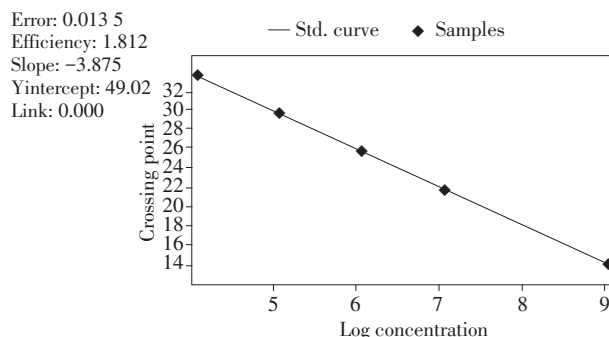
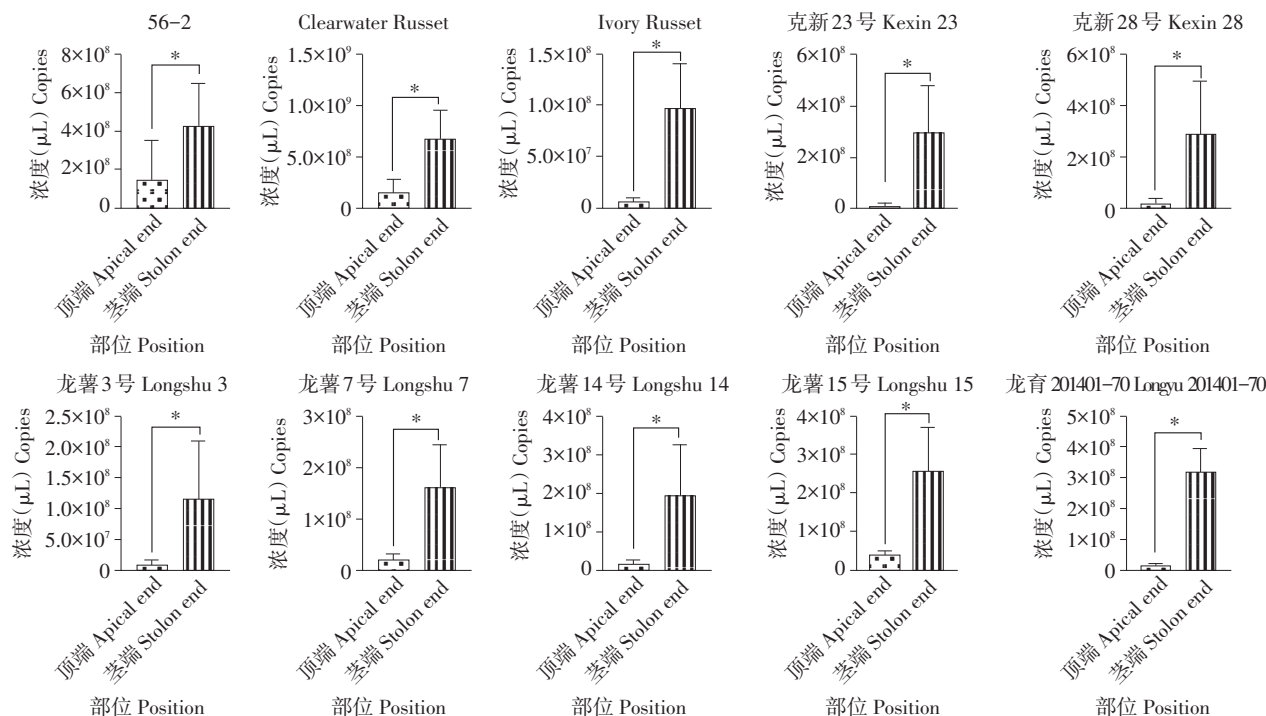


图2 通用PVY标准曲线

Figure 2 Standard curve for PVY general



注: *表示两个处理间有显著差异($P < 0.05$)。

Note: * indicates significant difference between the two treatments at $P < 0.05$.

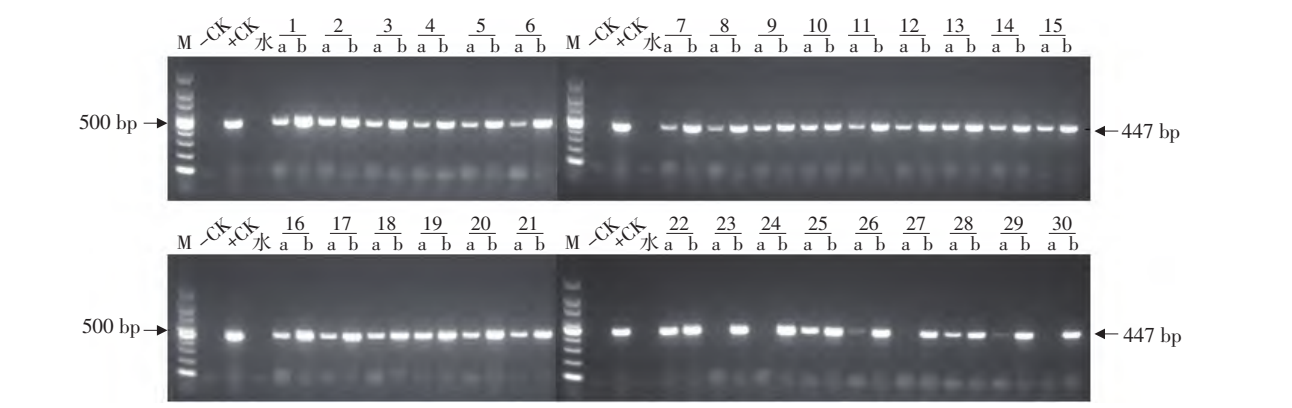
图3 马铃薯休眠块茎不同部位PVY的qRT-PCR检测

Figure 3 qRT-PCR detection for PVY in different parts of dormant potato tuber

2.3 RT-PCR批量检测马铃薯休眠块茎样品顶端与茎端芽眼组织PVY

选取‘Ivory Russet’品种100个带病的马铃薯休眠块茎样品4合1合样检测, 分别提取顶端与茎端芽眼组织病毒总RNA, 顶端芽眼组织共检测25个样品, 茎端芽眼组织共检测25个样品, 合计50个样品, 阴阳质控均为黑龙江省农业科学院经济

作物研究所马铃薯质检中心保存的无毒块茎和感染PVY的块茎样品, 采用RT-PCR方法检测, 琼脂糖凝胶电泳结果如图5所示, 图5A、5B、5C分别为20、20和10个马铃薯块茎样品的RT-PCR检测结果, 发现所有样品顶端与茎端的芽眼组织检测均为阳性, 但顶端芽眼组织条带亮度均低于茎端芽眼组织, 条带宽度也较茎端芽眼组织窄些。



注: M. 100 bp Marker, -CK. 阴性对照, +CK. 阳性对照, 水. 水对照; a. 顶端芽眼组织样品, b. 茎端芽眼组织样品; 1~3. ‘龙薯 15 号’, 4~6. ‘龙育 201401-70’, 7~9. ‘龙薯 14 号’, 10~12. ‘龙薯 3 号’, 13~15. ‘龙薯 7 号’, 16~18. ‘Ivory Russet’, 19~21. ‘Clearwater Russet’, 22~24. ‘56-2’, 25~27. ‘克新 23 号’, 28~30. ‘克新 28 号’。

Note: M. 100 bp Marker, -CK. Negative control, +CK. Positive control, Water. Water control; a. Apical end bud eye tissue sample, b. Stolon end bud eye tissue sample; 1-3. 'Longshu 15', 4-6. 'Longyu 201401-70', 7-9. 'Longshu 14', 10-12. 'Longshu 3', 13-15. 'Longshu 7', 16-18. 'Ivory Russet', 19-21. 'Clearwater Russet', 22-24. '56-2', 25-27. 'Kexin 23', and 28-30. 'Kexin 28'.

图 4 马铃薯休眠块茎不同部位 PVY 的 RT-PCR 产物检测

Figure 4 RT-PCR product detection for PVY in different parts of dormant potato tuber

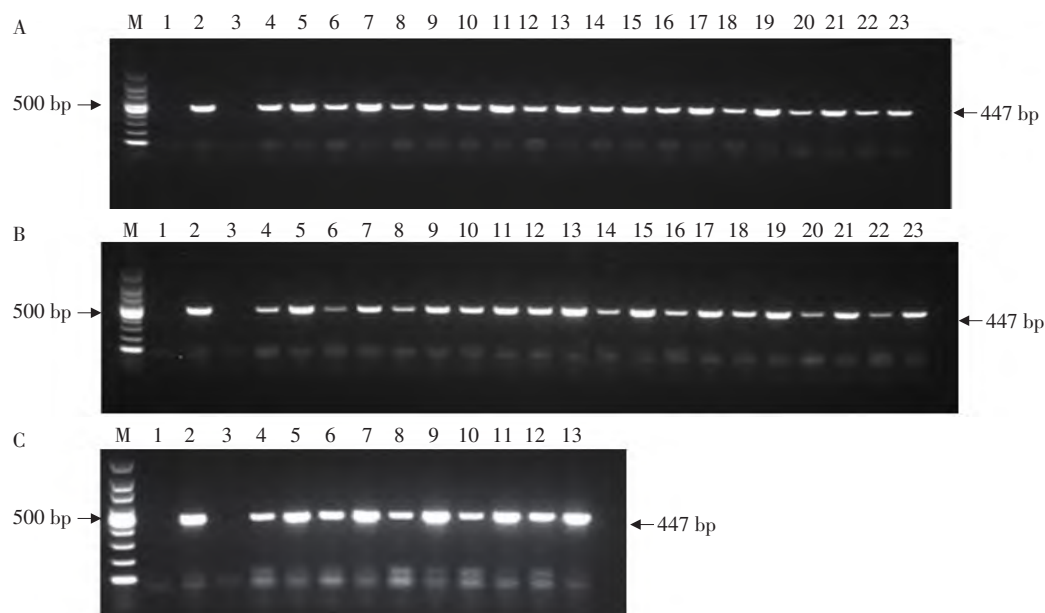
表 2 不同品种(系)马铃薯休眠块茎不同部位 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测 PVY

Table 2 RT-PCR product detection for PVY in different parts of dormant tubers of different varieties (lines) by agarose gel electrophoresis

品种(系) Variety (line)	编号 Number	检测部位 Detection site		品种(系) Variety (line)	编号 Number	检测部位 Detection site	
		顶端芽眼组织 Apical end bud eye tissue	茎端芽眼组织 Stolon end bud eye tissue			顶端芽眼组织 Apical end bud eye tissue	茎端芽眼组织 Stolon end bud eye tissue
龙薯 15 号 Longshu 15	Tuber 1	++	+++	Ivory Russet	Tuber 1	+	+++
	Tuber 2	++	+++		Tuber 2	+	+++
	Tuber 3	+	+++		Tuber 3	+	++
龙育 201401-70 Longyu 201401-70	Tuber 1	+	+++	Clearwater Russet	Tuber 1	++	+++
	Tuber 2	+	+++		Tuber 2	+	+++
	Tuber 3	+	++		Tuber 3	+	+++
龙薯 14 号 Longshu 14	Tuber 1	+	++	56-2	Tuber 1	++	+++
	Tuber 2	+	++		Tuber 2	-	+++
	Tuber 3	+	++		Tuber 3	-	+++
龙薯 3 号 Longshu 3	Tuber 1	+	++	克新 23 号 Kexin 23	Tuber 1	++	+++
	Tuber 2	+	++		Tuber 2	+	+++
	Tuber 3	+	++		Tuber 3	-	+++
龙薯 7 号 Longshu 7	Tuber 1	++	+++	克新 28 号 Kexin 28	Tuber 1	+	++
	Tuber 2	++	+++		Tuber 2	+	++
	Tuber 3	++	+++		Tuber 3	-	++

注: ‘+’为阳性, ‘-’为阴性, ‘+’数量越多表明条带亮度越高。

Note: ‘+’ indicates positive, ‘-’ indicates negative, and the more ‘+’, the brighter the band is.



注: M. 100 bp Marker, 1. 阴性对照, 2. 阳性对照, 3. 水对照, 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22. 顶端芽眼组织样品, 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23. 茎端芽眼组织样品。

Note: M. 100 bp Marker, 1. Negative control, 2. Positive control, 3. Water control, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22. Apical end bud eyes tissue sample, and 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23. Stolon end bud eyes tissue sample.

图5 马铃薯休眠块茎样品不同部位批量检测的RT-PCR检测结果

Figure 5 RT-PCR batch detection for different parts of dormant potato tuber samples

通过实际检测应用的结果表明, 对马铃薯休眠块茎检测时, 茎端芽眼组织取样相比于顶端芽眼组织取样能够更加精准的检测出PVY。

3 讨论

马铃薯种薯病毒病的检测是种薯质量评估的重要手段, 国内外都非常重视种薯块茎的抽样检测, PVY危害马铃薯生产较为严重, 因此, PVY是种薯收获后全程质量检测、认证程序的主要内容之一^[7]。不同病害检测部位不同^[20-24], 当多种病害同时检测, 需要在不同时间、不同部位多次取样, 是影响块茎收获后检测效率的主要原因。

块茎病毒检测比叶片难度大, 叶片中病毒的含量较其他部位高。而且, 叶片鲜嫩, 细胞破碎释放病毒容易, 简单研磨就可以获得可供检测的病毒量, 而块茎中干物质多, 富含大量的多糖、酚类化合物和次级代谢产物^[25], 分布不均。Browning等^[26]注意到块茎中PVY分布的差异, 研

究了有助于增加PVY浓度的打破休眠处理, 对打破休眠后的块茎进行测试, 并没有探究种薯收获后休眠块茎中不同组织部位之间PVY分布的差异。本研究应用qRT-PCR检测方法对‘56-2’‘Ivory Russet’‘Clearwater Russet’‘龙薯14号’‘龙薯3号’‘龙薯15号’‘龙育201401-70’‘龙薯7号’‘克新23号’和‘克新28号’10个马铃薯品种(系)顶端与茎端芽眼组织检测发现, 茎端芽眼组织的病毒含量显著高于顶端芽眼组织。通过RT-PCR的方法对10个马铃薯品种(系)休眠块茎和带病块茎批量检测发现, 所有马铃薯品种(系)的茎端芽眼组织条带亮度均高于顶端芽眼组织, 另外, ‘56-2’的样品2和‘克新23号’‘克新28号’‘56-2’的样品3马铃薯休眠块茎顶端与茎端的芽眼组织检测时发现, 块茎顶端芽眼组织没有检测到病毒, 而茎端芽眼组织则能够精准的检测到病毒, 这可能由于顶端芽眼组织的病毒浓度未达到检出限。本研究结果与Gugerlj和Gehriger^[16]的报道存在

差异, Gugerlj 和 Gehriger 应用 ELISA 的方法对经过 Rindite 处理后打破休眠前‘Bintje’‘Desiree’和‘Sirtema’3个马铃薯品种块茎顶端和脐部(茎端)进行检测, 通过比较 ELISA 消光值发现, PVY 在休眠块茎顶端检测到的消光值高于脐部(茎端), 另外, ‘Bintje’品种的块茎只有在打破休眠后才能可靠的鉴定出 PVY 病毒。这可能是由于 ELISA 方法更适实验室日常检测工作中^[9], 用于评估薯块是否有病毒, 对病毒含量多少的评价只能大概推断, 而 qRT-PCR 检测技术灵敏度高、特异性强, 能够精准的检测出马铃薯休眠块茎中的病毒含量^[13]。范国权等^[7]应用3种常规病毒检测方法(DAS-ELISA、RT-PCR 和 Real-time PCR)对马铃薯大田种薯 PVY 检测, 结果表明, 对于休眠块茎样品的检测, 血清学检测技术的风险较大, 有可能会因为休眠块茎中病毒含量未达到检出限而出差错, RT-PCR 和 qRT-PCR 的检测方法更适合于休眠块茎的检测。聂峰杰等^[27]采用 RT-PCR、ELISA 和胶体金免疫层析技术3种方法对马铃薯原原种及原种 PVY 检测, 发现 RT-PCR 检出率显著高于其他2种方法。

本研究说明了 PVY 在马铃薯休眠块茎不同部位的积累情况, 针对不同马铃薯品种(系)在休眠块茎中 PVY 病毒检测时更多取样方案的选择, 特别是为种薯块茎多种病害检测提供了一次性取样的理论依据, 简化了操作程序, 提高工作效率, 为促进马铃薯病害的早期监测和有效防治提供可靠的技术支持。另外, 本研究中供试的10个马铃薯品种(系)在休眠块茎茎端芽眼组织取样能够更加精准的检测出 PVY, 该取样方法是否适用于其他马铃薯品种(系)还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 吕金庆, 杨晓涵, 温信宇. 马铃薯切种机械的研究现状与发展趋势 [C]//金黎平, 吕文河. 马铃薯产业与美丽乡村. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2020: 465-469.
- [2] 郎贤波, 姜成模, 金顺福, 等. 防蚜虫药剂对脱毒马铃薯退化的影响 [C]//陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与粮食安全. 哈尔滨: 哈

尔滨工程大学出版社, 2009: 297-299.

- [3] 徐宁, 张洪亮, 张荣华, 等. 中国马铃薯种植业现状与展望 [J]. 中国马铃薯, 2021, 35(1): 81-96.
- [4] 张富荣, 戎素平, 张艳彦, 等. 马铃薯主要病毒病对种薯质量的影响 [J]. 种子, 2019, 38(3): 97-99.
- [5] Li J W, Wang B, Song X M, *et al.* Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) influence vegetative growth, physiological metabolism, and microtuber production of *in vitro*-grown shoots of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Plant Cell, 2013, 114(3): 313-324.
- [6] Rahman M S, Akanda A M. Infection pattern of PVY and PLRV in potato tubers obtained from potato plants infected with both the viruses [J]. The Agriculturists, 2008, 6(1-2): 118-123.
- [7] 范国权, 吕典秋, 高艳玲, 等. 中国马铃薯种薯质量检测认证现状及建议 [J]. 中国马铃薯, 2018, 32(3): 184-190.
- [8] 张冲云, 闻富生, 林梅. 无公害马铃薯病虫害防控技术研究 [J]. 农民致富之友, 2019(13): 83.
- [9] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 中国马铃薯病虫害检测技术标准解析 [J]. 中国马铃薯, 2019, 33(4): 227-236.
- [10] 魏琪, 胡林双, 董学志, 等. 马铃薯环腐病菌 Real-time Taqman-PCR 检测体系的建立 [J]. 中国马铃薯, 2010, 24(5): 301-305.
- [11] 张威, 白艳菊, 文景芝, 等. 马铃薯六种主要病毒通用 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. 中国马铃薯, 2015, 29(4): 222-227.
- [12] 李玉琦, 李秋丽, 王雅丽, 等. 马铃薯 Y 病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测体系的建立及应用 [J]. 中国蔬菜, 2020(12): 22-27.
- [13] Bright O A, Patrick J S, Philip H B, *et al.* Simultaneous detection of potato viruses PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 142(1-2): 1-9.
- [14] Sierra A, Gallo Y, Estrada M, *et al.* Detection of four RNA viruses in commercial and informal potato seed tubers in Antioquia (Colombia) [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2021, 54(5-6): 273-294.
- [15] Bentsink L, Leone G, Beckhoven, *et al.* Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(4): 647-655.
- [16] Gugerlj P, Gehriger. 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定人工打破休眠期的马铃薯块茎中的马铃薯卷叶病毒和马铃薯 Y 病

- 毒[J]. 郭素华, 译. 中国马铃薯, 1990, 4(1): 60-62.
- [17] 范国权, 高艳玲, 申宇, 等. 马铃薯病毒检测技术在生产中的应用[C]//屈冬玉, 陈伊里. 马铃薯产业与中国式主食. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2016: 448-452.
- [18] 孙琦, 张春庆, 孟昭东, 等. 马铃薯X、Y病毒的复合RT-PCR检测体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 737-738.
- [19] 尚慧. 马铃薯Y病毒不同株系分离物复合侵染对马铃薯的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [20] 王东, 句梦娜, 赵远征, 等. 西兰花轮作及其残体还田对土壤中病原菌微生物核数量、黄萎病发生及马铃薯产量的影响[J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1297-1303.
- [21] 张海斌, 蒙美莲, 刘坤雨, 等. 不同轮作模式对马铃薯干物质积累、病害发生及产量的影响[J]. 作物杂志, 2019(4): 170-175.
- [22] 温宏昌, 裴国平, 吴巧英, 等. 不同栽培模式对马铃薯主要病害及块茎生理病变的影响[J]. 现代园艺, 2017(23): 10-13.
- [23] 张威, 魏旭言, 高艳玲, 等. 马铃薯A病毒不同分离物的侵染鉴定及致病力分析[J]. 中国马铃薯, 2021, 35(6): 568-574.
- [24] 白艳菊, 韩树鑫, 高艳玲, 等. 马铃薯Y病毒对不同马铃薯品种的致病力[J]. 西北农业学报, 2017, 26(11): 1713-1720.
- [25] 赵宝懿, 程李香, 林必博, 等. 两种马铃薯块茎总RNA提取方法的比较[J]. 广东农业科学, 2010, 37(1): 124-127.
- [26] Browning I A, Fox A, Evans F. Direct tuber testing for potato virus Y (PVY) by ELISA and real-time PCR [C]//Proceedings Crop Protection in Northern Britain. Dundee, UK, 2004.
- [27] 聂峰杰, 张丽, 巩楮, 等. 三种方法对马铃薯脱毒种薯病毒检测比较研究[J]. 中国种业, 2015(4): 36-39.