

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)06-0568-07

病虫害防治

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.06.012

马铃薯 A 病毒不同分离物的侵染鉴定及致病力分析

张 威¹, 魏旭言¹, 高艳玲¹, 范国权¹, 邱彩玲²,
孙旭红¹, 武新娟¹, 张俐俐¹, 白艳菊^{1*}

(1. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 昭通学院农学与生命科学学院, 云南 昭通 657000)

摘 要: 马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA)是马铃薯生产上较常见的病毒之一, 植株感病症状与品种、病毒株系和环境条件有关。为研究 PVA 不同分离物对马铃薯的致病力, 将 3 种遗传背景不同的 PVA 分离物纯毒源, 分别接种到指示植物‘黄花烟’和马铃薯品种‘克新 13 号’上, 应用 qRT-PCR 检测技术进行病毒侵染鉴定, 并观察其致病性差异。结果表明, 3 种 PVA 分离物均可成功侵染‘黄花烟’和‘克新 13 号’, 通过接种后‘黄花烟’叶片的症状表现, 推断 3 种分离物的致病性具有一定差异。在马铃薯上分离物 2017-171 致病力表现为最强, 不仅在植株体内病毒含量最高, 可致使叶片出现叶缘皱缩、轻花叶, 还能导致马铃薯块茎严重裂口、芽眼变深; 其次是分离物 KB117, 病毒侵染速度较快但病毒含量低, 植株症状相对明显, 叶缘变尖、波浪状皱缩, 块茎发生畸形且芽眼变深; 最后是分离物 2017-176, 植株仅个别叶片呈现轻微叶缘皱缩, 块茎未出现畸形只存在芽眼变深症状, 病毒侵染速度相对慢但病毒含量居中。PVA 不同株系的致病性分析为其有效防治提供了有价值的理论依据。

关键词: 马铃薯 A 病毒(PVA); 分离物; 病毒含量; 感病症状; 致病力

Infection Identification and Pathogenicity Analysis of Different Potato Virus A Isolates

ZHANG Wei¹, WEI Xuyan¹, GAO Yanling¹, FAN Guoquan¹, QIU Cailing²,

SUN Xuhong¹, WU Xinjuan¹, ZHANG Lili¹, BAI Yanju^{1*}

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. College of Agronomy and Life Sciences, Zhaotong University, Zhaotong, Yunnan 657000, China)

Abstract: Potato virus A (PVA) is one of the common viruses in potato production. Symptoms of plants infected with the virus are related to varieties, virus strains and environmental conditions. In order to study the pathogenicity of different PVA isolates to potato, the indicator plant 'Rustica Tobacco' and the potato variety 'Kexin 13' were inoculated with three PVA isolates with different genetic backgrounds. The qRT-PCR detection technology was used to identify virus infection and observe the difference of pathogenicity. All the isolates infected 'Rustica Tobacco' and 'Kexin 13' successfully. According to the leaf symptoms of 'Rustica Tobacco' inoculated with the three isolates, it was inferred that

收稿日期: 2021-12-16

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资助(CARS-09); “农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX07)。

作者简介: 张威(1981-), 女, 副研究员, 主要研究方向为马铃薯种薯质量控制体系、病毒病致病机理研究。

*通信作者(Corresponding author): 白艳菊, 研究员, 主要研究方向为马铃薯种薯质量控制体系、病毒病致病机理研究, E-mail: yanjubai@163.com。

the pathogenicity of the three PVA isolates was different. The virulence of isolate 2017-171 was the strongest in potato, which not only had the highest virus content in the plant, but also caused leaf edge shrinkage, mild mosaic, severe tuber crack and deep eye. Secondly, the isolate KB117 had stronger pathogenicity, faster virus infection speed, but lower virus content. The symptoms of infected plants were relatively obvious, with sharp and wavy leaf margins, deformed tubers and deep eyes. Isolate 2017-176 had the lowest pathogenicity. Only a few leaves showed slight leaf edge shrinkage and tubers were not deformed, only with deep eyes. Virus infection speed was relatively slow, but virus content was in the middle. The results of this experiment provide valuable theoretical basis for strain identification, prevention and control of PVA.

Key Words: potato virus A (PVA); isolate; virus content; symptom; pathogenicity

病毒病一直以来都是危害马铃薯生产, 导致块茎减产并影响品质的主要因素。目前, 侵染马铃薯的病毒约有 50 余种^[1,2], 其中马铃薯 A 病毒 (Potato virus A, PVA) 是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 成员^[3], 也是常见的侵染马铃薯主要病毒之一。一般情况下, PVA 单独侵染马铃薯严重时减产可达 40% 左右^[4], 而当 PVA 与其他病毒复合侵染, 可导致更严重的产量损失^[5-7]。所以 PVA 的危害性已经受到世界各国的重视, 多个国家将其列为检疫性有害生物, 中国 2007 年也将 PVA 列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》^[8]。国内马铃薯 PVA 的相关研究多集中在病毒检测和分离鉴定方法上, 且已初步取得成果^[9-11], 但对于 PVA 不同分离物在马铃薯生长发育过程中引起的致病性研究较少。PVA 不同分离物因其核酸或所编码蛋白的差别, 在马铃薯上引起的致病症状有所不同。明确 PVA 分离物的致病力表现, 从传统生物学症状着手, 结合分子生物学方法, 深入研究其致病性, 可为 PVA 病毒的鉴定与防治提供理论依据。

早在 1990 年, Jones^[12]对 PVA 侵染马铃薯后引起症状与品种的关系就有报道, 将 PVA 接种到 12 个马铃薯品种上, 各品种敏感度不同, 出现不被侵染、无症状感染、轻症状和重症状表现, 而不同株系的 PVA 在同一品种上的致病症状也有差异。本研究选择 PVA 3 个遗传背景不同的分离物, 分别接种在指示植物‘黄花烟’和较敏感马铃薯品种‘克新 13 号’上, 观察其致病性差异, 比较马铃薯植株体内病毒含量、叶片及块茎症状的表现, 以明确 3 个分离物对马铃薯生长发育的影响,

对 PVA 的鉴定及防治具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯原种‘克新 13 号’和指示植物‘黄花烟’ (*Nicotiana rustica*), 由原黑龙江省农业科学院马铃薯研究所提供。

PVA 3 个遗传背景不同的分离物 2017-171、KB117 和 2017-176, 由原黑龙江省农业科学院马铃薯研究所测序并保存。

1.2 试验试剂

M-MLV 反转录酶试剂购自 Promega 公司; RNA 酶抑制剂、dNTP、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 均购自于 Takara 公司; Trizol 提取液购自 Invitrogen 公司; 75% 乙醇、异丙醇、氯仿、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 等试剂为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 植物种植

在智能温室中, 按照珍珠岩: 炉灰: 草炭 = 1: 1: 3 的比例配制基质, 混匀后 121℃ 湿热灭菌 30 min, 冷却后装在口径为 25 cm 的花盆中。浇透水后将‘黄花烟’的种子均匀撒播, 覆土 1.0 cm 左右, 待苗长至 2~3 cm 时分苗、移栽^[13]。马铃薯块茎芽眼朝上栽到盆中再覆土。

1.3.2 摩擦接种

待植株 4~6 叶期, 选择在阴天或晚上, 采用摩擦方式接种。在植株中上部两片对称叶上均匀喷洒适量碳化硅细粉, 然后用棉签沾 PVA 病毒汁液摩擦接种 [毒源: 接种缓冲液 (含 32 mmol/L Na_2SO_3 和 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.5) = 1 g:

3.3 mL], 30~60 min后清水冲洗掉残余病毒汁液^[14]。

对照(Mock)植株用接种缓冲液摩擦接种叶片, 方法同上。每个处理5次重复。接种后避光过夜。取新生的系统叶片进行qRT-PCR检测, 确认是否已成功接种PVA, 并系统感染。

1.3.3 总RNA提取及cDNA合成

试验采用Trizol法提取植物总RNA, 操作步骤参考Trizol使用说明书。提取后的RNA采用紫外分光光度计测RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值, 当比值在1.8~2.0说明RNA的纯度较好, 可以进行后续试验。先将其保存于-70℃备用。

取1 μg总RNA, 使用Takara公司的M-MLV反转录试剂盒, 参照说明书进行cDNA合成, 于-20℃保存备用。

1.3.4 TaqMan 荧光定量PCR 探针和引物的选择与合成

参考Bright等^[15]PVA的检测方法。PVA的特异性探针和引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。探针PVA 102-probe序列为: 5'-Texas-CACTACCAATGCTCAAAGGTAGAGT-GTCG-BHQ-3'; 上游引物PVA102-F: 5'-TGTCGATTAGGTACTGCTGGGAC-3'; 下游引物PVA102-R: 5'-TGCTTTGGTTTGTAAAGATAG-CAAGTG-3', 扩增片段长度为132 bp。

1.3.5 TaqMan 荧光定量PCR 扩增

反应体系为, 模板cDNA 2 μL, 上、下游引物各0.5 μL(10 μmol/L), 探针0.5 μL, 10 × 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。用水作为阴性对照, 取浓度为 2.72×10^6 copies/μL的质粒作为阳性对照, 每个样品3次重复。反应程序: 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环。将样品放入LightCycler® 480 荧光定量仪进行TaqMan RT-qPCR扩增。

2 结果与分析

2.1 PVA 不同分离物对指示植物‘黄花烟’的致病性差异

当接种‘黄花烟’第7 d时, 分别取新生叶进行PVA的qRT-PCR检测, 检测结果均为阳性,

表明PVA 3个分离物可以成功感染‘黄花烟’。随着时间的推移, 其系统发病症状逐渐表现出来, 图1为接种15 d后的症状表现。

不同分离物在‘黄花烟’上的症状表现各有不同(图1)。与对照相比, 分离物2017-171感染‘黄花烟’后表现出叶片皱缩、泡斑和叶缘变形等症状; 分离物KB117感染后, 除了叶缘微皱缩外, 还伴有明脉症状; 分离物2017-176感染后叶片症状比较轻, 仅表现微皱缩和点状轻花叶现象。通过3个分离物感染‘黄花烟’后叶片的症状差异, 可以初步推断他们的致病性具有一定差异。

2.2 PVA 不同分离物对马铃薯品种‘克新13号’的致病性差异

2.2.1 PVA 不同分离物在‘克新13号’植株体内病毒含量差异

分别在接种后的第2、5、10、15、20和25 d取新生叶片, 进行PVA的qRT-PCR检测。检测结果显示, 3个分离物均可以成功感染‘克新13号’。

每个分离物在6个时间点病毒在植株体内变化趋势相似, 即病毒进入植株体内, 随着时间的推移病毒含量逐渐增加, 达到发病高峰期, 随后病毒含量开始降低。但3个分离物在侵入植株体内的初始时间、发病速度、发病高峰期的病毒含量方面具有一定的差异(表1)。

分离物2017-171接种后的第2 d qRT-PCR检测结果为阳性, 表明该分离物可以在接种后第2 d成功感染‘克新13号’, 其病毒在体内含量为 1.67×10^1 copies/μL, 随着时间的推移, 植株体内病毒含量逐渐升高, 第20 d时达到最高值 3.90×10^7 copies/μL, 随后病毒含量又呈降低趋势; 分离物KB117接种后的第2 d开始感染‘克新13号’, 在第2~5 d病毒含量累积缓慢, 随后病毒含量大幅度升高, 第15 d时达到发病高峰期, 植株体内病毒含量达最高值 1.77×10^6 copies/μL, 随后呈降低趋势; 分离物2017-176接种后的第2 d未能感染‘克新13号’, 在第5 d时才呈现病毒含量有所升高趋势, 随后病毒含量大幅度升高, 第15 d时达到发病高峰期, 植株体内病毒含量达最高值 1.29×10^7 copies/μL, 随后病毒含量呈降低趋势, 表明此分离物感染植株相对较慢。

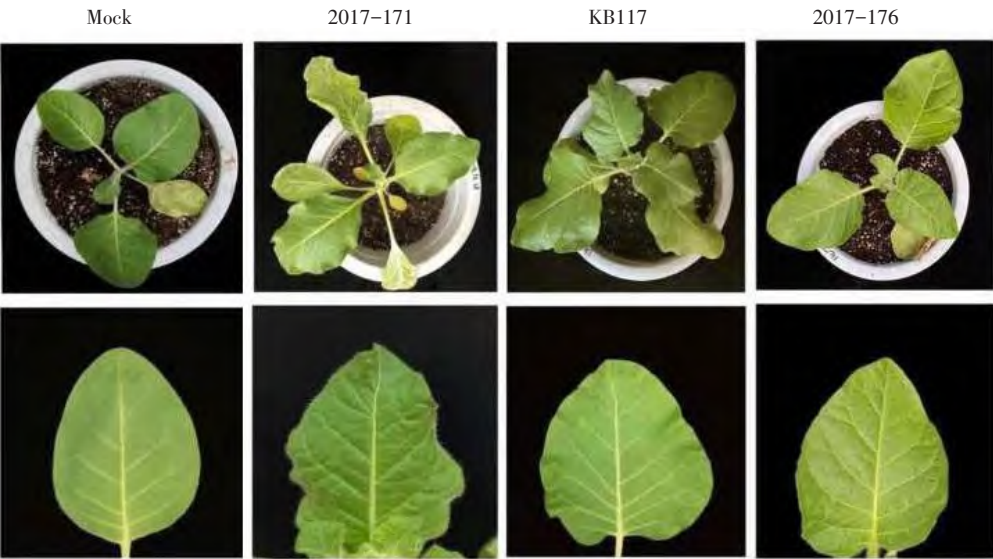


图1 PVA不同分离物接种‘黄花烟’的症状

Figure 1 Symptoms of 'Rustica Tobacco' inoculated with different PVA isolates

表1 不同PVA分离物植株体内病毒含量的变化(copies/ μ L)

Table 1 Changes of virus contents in plants inoculated with different PVA isolates

样品编号 Sample number	接种后天数(d) Days after inoculation					
	2	5	10	15	20	25
2017-171	1.67×10^1	1.11×10^4	5.05×10^6	1.93×10^7	3.90×10^7	9.13×10^6
KB117	1.06×10^1	1.31×10^1	4.97×10^4	1.77×10^6	1.01×10^6	3.95×10^5
2017-176	9.91×10^0	1.37×10^1	1.49×10^6	1.29×10^7	1.03×10^7	9.75×10^6
Mock	7.04×10^0	8.89×10^0	9.60×10^0	8.35×10^0	8.96×10^0	8.23×10^0

由以上分析可知,分离物2017-171和KB117均在接种后第2 d开始侵入植株体内,而2017-176侵染速度相对较慢;2017-171在接种后第20 d病毒含量达到高峰,而2017-176和KB117在第5~10 d病毒含量大幅度升高,都在15 d时植株体内病毒含量达到高峰,但KB117的高峰含量低于2017-171及2017-176。

2.2.2 PVA不同分离物侵染‘克新13号’植株症状差异

分别在接种后达到发病高峰期时观察植株发病症状。与对照相比,分离物2017-171接种‘克新13号’后呈现轻花叶、叶缘微皱缩等症状;分离物KB117接种‘克新13号’后会出现叶缘变尖、波浪状皱缩等症状;分离物2017-176接种后,症

状不明显, 仅个别叶片呈现轻微叶缘皱缩等症状(图2)。不同分离物接种‘克新13号’的植株症状

表现存在差异, 说明3个分离物致病力有一定差别, 但对植株整体长势影响不大。

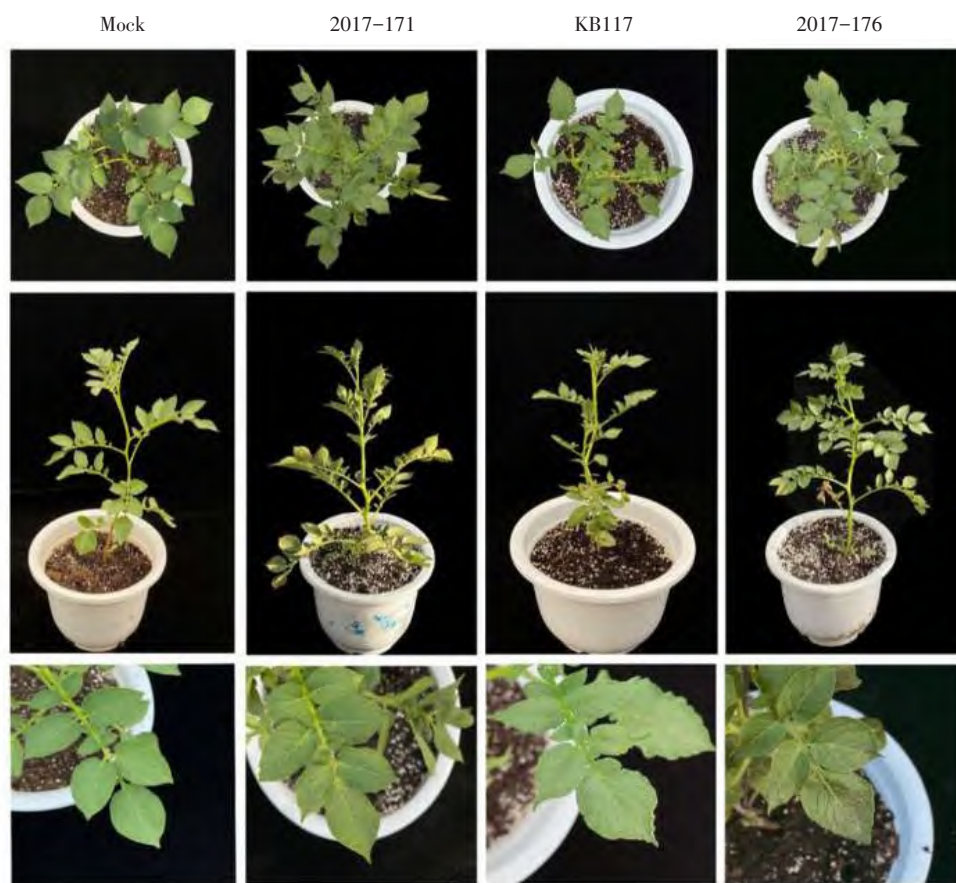


图2 不同PVA分离物接种‘克新13号’植株症状

Figure 2 Symptoms of 'Kexin 13' inoculated with different PVA isolates

2.2.3 PVA不同分离物侵染‘克新13号’块茎症状差异

从各分离物接种后的单株块茎个数和块茎症状可以看出(图3), 与对照相比, 整体趋势为, 单株块茎数减少、块茎变小、芽眼变深, 个别块茎出现变形等症状。其中典型的块茎症状与对照相比较, 分离物2017-171接种后块茎出现裂口、芽眼变深症状; 分离物KB117接种后块茎出现畸形症状、芽眼变深症状; 分离物2017-176接种后块茎仅出现芽眼变深症状。

3 讨论

PVA的寄主范围相对较窄, 主要以侵染茄科

等植物为主, 如马铃薯、番茄、洋酸浆、假酸浆、烟草等^[16]。其侵染症状于1914年首次被报道^[17], 并于1932年正式命名^[18]。PVA主要通过种薯传播和摩擦接触传播, 还可以通过蚜虫以非持久性方式传播。随着马铃薯种植面积不断扩大以及各地种薯调运而在世界范围内传播。在中国, 于1975年首次在黑龙江省克山县发现此病毒^[19], 而后几乎遍布于马铃薯的各主要产区^[20]。

PVA侵染马铃薯时, 其症状类型, 与马铃薯品种、病毒株系、环境条件等具有一定相关性^[21-23], 抗性较强品种, 一般不表现症状, 而致病性相对较强株系可以导致马铃薯敏感品种产生花叶、斑驳、皱缩等较严重症状。

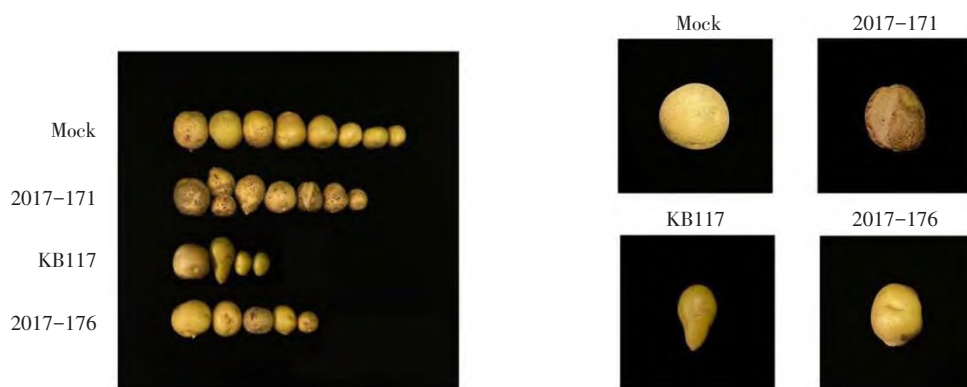


图3 不同PVA分离物接种‘克新13号’块茎症状

Figure 3 Symptoms of tubers of 'Kexin 13' inoculated with different PVA isolates

范国权等^[24]将马铃薯9种病毒接种在黑龙江省10个马铃薯主栽品种上,当PVA和PVY复合侵染品种‘克新13号’时,植株症状较其他品种明显,且产量影响显著。魏旭言^[25]将具有较强致病性的PVA分离物接种在10个马铃薯主栽品种上,有5个品种接种成功,其中‘克新13号’和‘丽薯6号’接种后植株及块茎致病症状较明显,测定发病高峰期PVA病毒含量,结果为‘克新13号’表现最高,说明PVA对此品种危害性最强。

不同PVA分离物在同一马铃薯品种上引起的致病症状也不相同。Valkonen等^[26]将PVA接种到马铃薯品种‘King Edward’上,根据侵染症状不同将PVA分离物分成了3组,分别为植株上部叶片典型性坏死、叶片斑驳和无感染症状3种类型,之后Rajamäki等^[22]研究又增加了一组,该株系可引起‘King Edward’全株叶片发黄、植株矮化。同时Rajamäki等^[22]将来源于不同国家的18个PVA分离物CP序列进行系统发育分析,发现其序列差异显著,存在明显多样性。

本研究将3种PVA分离物分别接种在指示植物‘黄花烟’和马铃薯品种‘克新13号’上,通过qRT-PCR检测,结果均为阳性,其中分离物2017-171症状最明显,导致‘黄花烟’叶片皱缩、泡斑和叶缘变形等症状,马铃薯植株叶片出现叶

缘皱缩并伴有轻花叶症状,块茎出现严重裂口、芽眼变深症状;KB117次之,可使‘黄花烟’叶缘微皱缩并伴有明脉症状,马铃薯植株叶缘变尖、波浪状皱缩,块茎发生畸形且芽眼变深;2017-176症状相对不明显,‘黄花烟’仅叶片微皱缩、点状轻花叶,马铃薯植株仅个别叶片呈现轻微叶缘皱缩,块茎未出现畸形只存在芽眼变深症状。同时进行qRT-PCR表达模式分析,发现2017-171在马铃薯体内病毒含量最高,其次为2017-176和KB117。综上分析看出,3种PVA分离物均可以成功侵染指示植物‘黄花烟’和马铃薯植株,且分离物2017-171致病力最强,不仅在植株体内含量最高,还能导致马铃薯块茎畸形并产生裂口现象。PVA不同株系的致病性分析为其有效防治提供了有价值的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Torrance L, Taliansky M E. Potato virus Y emergence and evolution from the Andes of South America to become a major destructive pathogen of potato and other Solanaceous crops worldwide [J]. *Viruses*, 2020, 12: 1-14.
- [2] Valkonen J P T. Potato viruses: economical losses and biotechnological potential [M]//Vreugdenhil D. *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. Amsterdam: Elsevier, 2007: 619-641.

- [3] 杜霞, 吴阔, 苏晓霞, 等. 马铃薯A病毒在云南省的发生及其P3蛋白序列分析[J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 516–523.
- [4] Puurand U, Valkonen J, Makinen K, *et al.* Infection *in vitro* transcripts from cloned cDNA of the potato A potyvirus [J]. Virus Research, 1996, 40(2): 135–140.
- [5] German T L. Potato virus A [M]//Stevenson W R, Loria R, Franc G D, *et al.* Compendium of potato diseases. 2nd ed. St Paul: APS Press, 2001: 66–67.
- [6] He C, Zhang W, Hu X, *et al.* Molecular characterization of a Chinese isolate of potato virus A (PVA) and evidence of a genome recombination event between PVA variants at the 3'-proximal end of the genome [J]. Archives of Virology, 2014, 159: 2457–2462.
- [7] Kreuze J F, Souza-Dias J A C, Jeevalatha A, *et al.* Viral diseases in potato [M]//Campos H, Ortiz O. The potato crop. Switzerland: Springer Nature, 2020: 389–430.
- [8] 刘刚. 《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》发布[J]. 农药市场信息, 2007(13): 38–39.
- [9] 罗文彬, 李华伟, 汤浩, 等. 马铃薯5种病毒多重PCR检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 280–288.
- [10] 刘洪义, 辛言言, 刘忠梅, 等. 马铃薯A病毒RT-LAMP检测方法的建立[J]. 中国农学通报, 2015, 31(11): 143–147.
- [11] 张维. 马铃薯A病毒湖南分离物株系鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [12] Jones R A C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars [J]. Annals of Applied Biology, 1990, 117(1): 93–105.
- [13] 徐洁. 指示植物鉴定马铃薯病毒技术的研究与应用[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(2): 73–75.
- [14] 张威, 白艳菊, 文景芝, 等. 马铃薯M病毒生物学特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2017, 48(1): 1–6.
- [15] Bright O A, Patrick J S, Philip H B. 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: 1–9.
- [16] Thomas P E. *Nicotiana megalosiphon*, a highly susceptible, new, and useful host for potato virus A [J]. Plant Disease, 2004, 88(10): 1160.
- [17] Orton W A. Potato wilt, leaf-roll and related diseases [M]. US Dep Agric Bull, 1914.
- [18] Murphy P A, Mckay R. A comparison of some European and American virus diseases of the potato [J]. Roy Dublin Soc Sci Proc, 1932, 20: 347–358.
- [19] 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.
- [20] 胡新喜, 雷艳, 何长征, 等. 湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析[J]. 中国马铃薯, 2012, 26(6): 358–361.
- [21] Nie X, Singh R P. Differential accumulation of potato virus A and expression of pathogenesis-related genes in resistant potato cv. Shepody upon graft inoculation [J]. Phytopathology, 2001, 91: 197–203.
- [22] Rajamäki M, Merits A, Rabenstein F, *et al.* Biological, serological, and molecular differences among isolates of potato A potyvirus [J]. Phytopathology, 1998, 88: 311–321.
- [23] Singh R, Nie X, Tai G C C. A novel hypersensitive resistance response against potato virus A in cultivar 'Shepody' [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 401–408.
- [24] 范国权, 高艳玲, 张威, 等. 马铃薯主要病毒侵染不同品种症状及对产量的影响[J]. 中国马铃薯, 2019, 33(1): 34–42.
- [25] 魏旭言. 马铃薯A病毒生物学检测及种群遗传学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [26] Valkonen J P T, Puurand U, Slack S A, *et al.* Three strain groups of potato A potyvirus based on hypersensitive responses in potato, serological properties, and coat protein sequences [J]. Plant Disease, 1995, 79: 748–753.