

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2015)01-0042-04

云南省马铃薯脱毒试管苗和微型薯病毒检测与分析

张丽珍, 董家红*, 郑宽瑜, 吴 阔, 苏晓霞, 方 琦, 张仲凯*

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室,
农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 云南 昆明 650223)

摘 要: 病毒病是制约马铃薯产量和质量的重要因素。马铃薯脱毒试管苗、微型薯是生产脱毒种薯的重要环节。本研究于2010~2013年对收集自云南省的试管苗274个、微型薯356个, 共计630个样品。应用电子显微镜观察, 并采用DAS-ELISA检测了8种病毒: 马铃薯S病毒、马铃薯卷叶病毒、马铃薯Y病毒、马铃薯X病毒、马铃薯A病毒、马铃薯M病毒、番茄斑萎病毒和烟草环斑病毒, 发现试管苗和微型薯中马铃薯S病毒检出率最高(21.27%), 其次是PLRV(5.71%); 还检测到了新出现的感染马铃薯的番茄斑萎病毒和烟草环斑病毒。研究结果为马铃薯种薯生产过程中病毒病的检测防控提供了参考。

关键词: 试管苗; 微型薯; 脱毒种薯; 主要病毒; 检出率; 分析

Virus Detection and Analysis of *in vitro* Plantlets and Minutubers of Virus-free Seed Potato in Yunnan Province

ZHANG Lizhen, DONG Jiahong*, ZHENG Kuanyu, WU Kuo, SU Xiaoxia, FANG Qi, ZHANG Zhongkai*

(Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology, Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: The viral diseases are important constraints to yield and quality of potato. *In vitro* plantlets and minutubers are the key steps in the production of virus-free seed potato. In this research, 630 samples including 274 *in vitro* plantlets and 356 minutubers were collected from 2010 to 2013 in Yunnan Province. The samples were detected through the electron microscopy. DAS-ELISA was used to test PVS, PLRV, PVY, PVX, PVA, PVM, TSWV and TRSV. The results showed that PVS and PLRV were two predominant viruses, and 21.27% and 5.71% of the samples were infected by PVS and PLRV, respectively. TSWV and TRSV were two emerging viruses infecting potato in China. The results could provide a consult for detection and control of potato virus diseases in potato production.

Key Words: *in vitro* plantlet; minutuber; virus-free seed potato; major virus; incidence; analysis

马铃薯是云南省的优势农作物, 是云南发展高原特色农业打造的“十二大品牌”之一, 2012年总种植面积58.6万 hm^2 , 总产量842.5万t, 但平均单产14.38 t/hm^2 , 远远低于世界上最高的国家荷兰

的平均单产(50 t/hm^2)水平, 也低于全国平均水平(22.5 t/hm^2)。

马铃薯以营养体为繁殖材料, 容易被病毒感染, 并传播扩散到子代, 造成病害逐年严重, 产

收稿日期: 2014-09-21

基金项目: 云南省现代农业马铃薯产业技术体系建设(2013KJTX003); 云南省农业科学院现代农业科研所及优秀团队建设(2014CZYY021); 云南省高层次科技人才培引工程(2011CI134)。

作者简介: 张丽珍(1968-), 女, 高级实验师, 主要从事马铃薯脱毒及病毒检测。

*通信作者(Corresponding author): 董家红, 研究员, 主要从事植物病毒学研究, E-mail: dongjhn@126.com; 张仲凯, 研究员, 主要从事植物病毒学研究, E-mail: zhongkai99@sina.com。

量逐年降低, 种薯种质严重退化^[1]。目前报道感染危害马铃薯的病毒有 40 余种, 且不断有新病害发生^[2,3]。近年来在中国影响马铃薯产业比较严重的主要有马铃薯 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 leaf roll virus, PLRV)^[3-6]。在缺乏抗性品种以及没有有效的病毒病防治药剂的情况下, 目前最有效的防控马铃薯病毒病害的措施就是使用脱毒马铃薯。所以, 在马铃薯生产中, 优质的脱毒种薯是提高马铃薯产量和质量的保障。

自 20 世纪 80 年代末期以来, 为解决生产中马铃薯种薯的退化问题, 云南省开始研究、推广脱毒种薯, 建立脱毒种薯生产体系及种薯质量监督检测体系^[6]。但在实际生产过程中, 由于各种薯生产单位技术水平参差不齐, 尤其是缺少对种薯质量的检测能力, 致使生产的种薯带毒率较高。生产上缺乏合格的脱毒种薯是限制云南省马铃薯产业发展的瓶颈问题。脱毒种薯生产的核心环节首先要保证脱毒试管苗的带毒率为零, 所以摸清各种薯生产单位脱毒试管苗以及微型薯的带毒情况, 是生产健康优质的马铃薯种薯的重要保障。本研究对云南省种薯生产单位的试管苗、微型薯进行了抽样, 通过电子显微镜负染色初步观察, 然后用酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测了云南省马铃薯脱毒试管苗和微型薯。检测结果有利于掌握云南省马铃薯种薯质量及病毒病发生情况, 对马铃薯种薯生产过程中的病毒检测和防控具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2010~2013 年, 对云南省昆明、曲靖、昭通、丽江、迪庆、楚雄、大理等地州市的马铃薯生产单位和公司的马铃薯试管苗、微型薯进行病毒检测, 品种主要为当地主栽品种‘合作 88’、‘会-2 号’、‘大西洋’、‘丽薯 6 号’、‘宣薯 2 号’、‘费乌瑞它’等。试管苗样品采用随机抽取, 取自昆明、丽江、昭通、曲靖。微型薯样品取自昆明、曲靖、昭通、丽江、迪庆、楚雄和大理, 有花叶、黄化、矮化、

卷叶和坏死等病毒症状的样品, 显示明显症状的样品取单个样品检测, 无明显病毒病症状的随机取样, 每地块随机取 5 点, 每点取 5 株, 催芽后各取一个芽眼混为 1 个样。所采集的样品有马铃薯脱毒试管苗 274 株, 微型薯 356 株。

1.2 方法

1.2.1 电子显微镜负染色方法

取试管苗、薯块芽组织, 加入等体积的 ddH₂O 后, 用刀片均匀切至植物粗汁液溢出, 用 Formvar 膜覆盖的铜网蘸取粗汁液, 用 2% 钨酸铵负染色, 置于 JEM100CX-II 型透射电镜下观察病毒粒体形态特征^[7]。

1.2.2 ELISA 方法

针对马铃薯主要病毒 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVA 和 PVM 进行 DAS-ELISA 检测, 部分样品根据电子显微镜负染色观测结果还检测了番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV)、烟草环斑病毒(Tobacco ringspot virus, TRSV)。马铃薯病毒检测试剂盒购自美国 Agdia 公司, 按照说明书进行检测。

2 结果与分析

2.1 电镜观察结果与分析

对于试管苗, 全部制样观察, 而微型薯, 同一批次的样品随机取 5 个薯块催芽后取芽眼制样。观察结果发现 20% 以上的样品能观察到典型的病毒粒体, 病毒粒体形态主要有如下 4 种: 轻微弯曲线状粒体, 大小为 515 nm × 13 nm, 初步判断为 PVX; 等轴球状粒体, 直径约 30~40 nm, 初步判断主要为 PLRV, 其次可能是 TRSV; 刚直线状粒体, 大小为 650 nm × 12 nm, 初步判断为 PVS; 弯曲线状的粒体, 大小为 760 nm × 11 nm, 初步判断主要为 PVY; 部分样品为被膜的球形病毒粒体, 直径为 80~85 nm, 初步判断为番茄斑萎病毒属病毒。

2.2 ELISA 检测结果与分析

检测试管苗 274 份样品, 总病毒检出率为 24.08%, 检测到了 PVX、PVS、PVY、PVA、PLRV、TSWV, 没有检测到 PVM。TSWV 从昆明的样品检出, 而其它地方的试管苗没有检测到。其中检测率最高的为 PVS, 检出率为 14.60%, 其次为 PLRV, 检出率为 4.74%。昆明样品中有 3 个样品分别为 PVY/PVS、PVA/PLRV、PVX/PVS/PLRV 复合侵染, 其余样品没有检测到复合侵染情况(表 1)。

表1 试管苗病毒检测
Table 1 Virus detection of *in vitro* plantlets

地点 Location	样品数 (No.) Sample size	PVX	PVY	PVA	PVM	PVS	PLRV	TSWV
昭通 Zhaotong	7	0	1	0	0	1	0	0
曲靖 Qujing	25	0	1	0	0	2	1	0
昆明 Kunming	213	2	4	2	0	25	7	4
丽江 Lijiang	29	1	1	1	0	12	5	0
合计 Total	274	3	7	3	0	40	13	4
检出率(%) Incidence		1.09	2.55	1.09	0	14.60	4.74	1.46

检测微型薯 356 个样品, 总病毒检出率为 35.11%, 检测到了 PVX、PVS、PVY、PVA、PLRV、TSWV、PVM, 与试管苗一样仅从昆明样品中检测到了 TSWV, 昆明的 1 个样品中检测到

TRSV。检测率最高的 2 个病毒仍是 PVS 和 PLRV, 检出率分别为 26.40% 和 6.46%。检测到 10 个样品为复合侵染, 主要是 PVS/PLRV 复合侵染 (表 2)。

表2 微型薯病毒检测结果
Table 2 Virus detection of minitubers

地点 Location	样品数 (No.) Sample size	PVX	PVY	PVA	PVM	PVS	PLRV	TSWV	TRSV	Mixed infection
昭通 Zhaotong	56	0	6	0	0	19	5	0	—	PVS/PLRV (2)
曲靖 Qujing	97	1	0	0	1	21	9	0	—	0
昆明 Kunming	47	1	0	0	0	16	3	6	1	PVS/PLRV (3)
丽江 Lijiang	60	1	0	0	0	4	1	0	—	0
迪庆 Diqing	52	2	1	1	0	6	0	0	—	PVX/PVY/PVS/PVA(1)
大理 Dali	18	0	0	0	0	10	2	0	—	PVS/PLRV (2)
楚雄 Chuxiong	20	0	3	0	0	12	3	0	—	PVS/PLRV (2)
文山 Wenshan	6	0	0	0	0	6	0	0	—	0
合计 Total	356	5	10	1	1	94	23	6	—	0
检出率(%) Incidence		1.40	2.81	0.28	0.28	26.40	6.46	1.69	—	2.81

注: “—”表示没有检测。 Note: “—” means no detection.

3 讨 论

自 2010~2013 年来, 检测云南省各地的 274 个试管苗和 356 个微型薯, 共计 630 个样品, 检出率最高的两个病毒是 PVS 和 PLRV, 检出率分别为 21.27% 和 5.71%, 这与张仲凯等^[6]2003 年报道的主要优势病毒 PVX、PVY 和 PLRV 有所不同, 但病毒种类变化不大。白艳菊等^[8]对 2004~2005 年云南省的 2 个试管苗样品和 28 个原原种样品检测结果, 试管苗带毒率 100%, 原原种带毒率 64.28%, 主要是 PVS 和 PVY, 复合侵染严重。本研究结果与白艳菊等^[8]报道的结果相比, 检出率有所减低, 复合

侵染情况也明显减少, 虽然当前云南省种薯质量较 2005 年前得到了明显改善, 但整个现状仍然令人堪忧。

本研究发现, PVS 在试管苗和原原种微型薯检出率均最高, 分别检到了 14.60% 和 26.40%, 结果与范国权等^[9]自 2004~2010 年对全国马铃薯病毒病跟踪调查相比发现, 整体病毒检出率呈下降趋势, 但试管苗中 PVS 病毒检出率仍然是最高。高艳玲等^[10]对黑龙江、内蒙古、甘肃、贵州等几个马铃薯种植大省的试管苗、原原种和大田样品检测发现, 检出率最高的病毒仍然为 PVS, 检出率 18.94%。PVS 检出率较高, 可能与该病毒较难脱离

有关, 需要进一步研究脱除PVS的脱毒技术。

昆明地区的试管苗和微型薯均检测到了TSWV, TSWV是近年在云南省的番茄、烟草上危害较重的病毒, 马铃薯是TSWV寄主之一, 主要由西花蓟马(*Frankliniella occidentalis*)传播^[1], 在一些送检试管苗样品中以及微型薯实地调查观察到了大量蓟马, 从这些样品中检测到了TSWV。昆明的1个样品检测到了TRSV。PVA、TSWV、TRSV属于检疫性有害生物, 应防止其传播扩散的风险。PVM仅检测到一个样品, 但仍然值得重视。

国标(GB 18133-2012)规定用于马铃薯各级别种薯的田间检测质量要求, 二级种的总病毒允许率最高为10%, 根据结果可知云南省试管苗的合格率为75.92%, 微型薯为64.89%, 与国标要求差距较远。核心因素是种薯生产体系不规范, 质量监督检测体系不健全, 种薯生产环节与质量监督检测严重脱节。云南省种薯生产单位普遍缺少检测所需设备和技术人员, 在种薯生产的整个过程中没有按国标或地标进行检测, 长期以往造成普遍认为只要通过茎尖剥离即能完成脱毒。近年来云南省通过现代农业马铃薯产业技术体系的建立, 在马铃薯生产的各个环节取得了显著成效, 尤其在提高种薯生产单位检测意识, 提升质量检测技术部门检测能力方面得到了明显改善, 对提高云南省脱毒种薯质量有积极的意义。

[参 考 文 献]

- [1] 郭志乾, 董凤林. 马铃薯病毒性退化与防治 [J]. 中国马铃薯, 2004, 8(1): 48-49.
- [2] Salazar L F. Potato virus and their control [M]. Lima: International potato center, 1996: 19.
- [3] Loebenstein G, Berger P H, Brunt A A, et al. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes [M]. Dordrecht: Kluwer, 2001: 65-67.
- [4] Wang B, Ma Y, Zhang Z, et al. Potato virus in China [J]. Crop Protection, 2011, 30: 1117-1123.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 方琦, 丁铭, 董家红, 等. 云南澳洲坚果苗木感染番茄斑萎病毒属病毒初报 [J]. 园艺学报, 2013, 40(2): 350-354.
- [8] 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.
- [9] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 我国马铃薯主产区病毒病发生情况调查 [J]. 黑龙江农业科学, 2014, 27(3): 68-72.
- [10] 高艳玲, 张威, 白艳菊, 等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查分析 [J]. 植物保护, 2011(8): 60-65.
- [11] Dong J H, Yin Y Y, Xu X Y, et al. First report of tomato spotted wilt virus in tomato and tobacco in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2010, 92(4): 121.

 辰翔矿业

辰翔矿业有限公司

专业生产马铃薯育种——膨胀蛭石

河北灵寿县辰翔矿业有限公司位于河北省石家庄市灵寿县, 是一家专业生产蛭石片、膨胀蛭石、珍珠岩的企业, 已有30多年的发展历史。辰翔公司根据马铃薯育种特点, 研发了育种专用膨胀蛭石。本公司生产的马铃薯专用膨胀蛭石性价比高, 已在国内十几家马铃薯育种公司应用, 并得到一致好评。本公司蛭石产品型号齐全, 也可根据客户需求订制生产。

如果您对我们的产品感兴趣, 欢迎致电联系, 索要资料、样品。

联系人: 薛 刚 15613123526、15833992815

地 址: 河北省石家庄市灵寿县燕川工业区

电 话: 0311-82616100 (传真)