

马铃薯纺锤块茎类病毒检测技术比较与选择

邱彩玲^{1,2}, 吕文河^{2*}, 魏琪¹, 吕典秋¹, 李学湛¹, 白艳菊^{1*}

(1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)是威胁我国马铃薯生产的重要病害之一, 目前有多种技术可应用于 PSTVd 的检测, 如生物学方法、电子显微镜技术、往返聚丙烯酰胺凝胶电泳(R-PAGE)、核酸斑点杂交(NASH)、RT-PCR 和 FQ RT-PCR。这些方法各有利弊, 互相补充, 构成了 PSTVd 的检测技术体系。日常工作中, 应根据自身条件及目的等科学地选择适宜的检测技术, 确保脱毒种薯/种苗的质量。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd); 检测技术; 比较与选择

Comparison and Selection of Potato Spindle Tuber Viroid Detection Techniques

QIU Cailing^{1,2}, LU Wenhe^{2*}, WEI Qi¹, LU Dianqiu¹, LI Xuezhao¹, BAI Yanju^{1*}

(1. Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is one of the important diseases that threatens the potato production in China. Now, there are some techniques for detection of PSTVd, such as biological method, electron microscope technique, R-PAGE, NASH, RT-PCR and FQ RT-PCR. These methods have advantages and disadvantages and they can complement each other, comprising a system for PSTVd detection. Daily work should be based on their own conditions and purposes, and the detection method be appropriately chosen to control the virus-free seed/seedling quality.

Key Words: potato spindle tuber viroid (PSTVd); detection technique; comparison and selection

马铃薯, 其经济价值在全世界的作物中占第四位。然而, 诸多的病害却威胁着马铃薯的生产, 其中马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)就是其中重要的一种。PSTVd 自 1922 年发现以来, 已经迅速地传播到了许多国家, 如加拿大、阿根廷、俄罗斯(前苏联)、波兰、匈牙利和保加利亚等, 后来又传入中国, 并已经造成了一定的经济损失。

PSTVd 具有高度的侵染性, 是引起马铃薯品种

退化和产量降低的主要病害之一。PSTVd 强系可引起减产 60%, 弱系减产 20%~35%, 并且会使块茎畸形, 变小, 降低马铃薯的产量和商品性, 造成严重的经济损失。由于该病害危害重, 易传播, 因此, 中国及很多国家和地区都将其列为检疫性病害, 足见此病害的严重性。PSTVd 在中国分布广泛, 一些染病地区马铃薯减产幅度高达 80%。

由于 PSTVd 能够随着马铃薯的无性繁殖传递给后代, 而且目前还很难通过茎尖剥离或者超低

收稿日期: 2013-10-24

基金项目: 黑龙江省农业科学院创新工程项目“黑龙江省马铃薯类病毒(PSTVd)致病力分析及品种抗性鉴定”; 现代农业产业技术体系专项基金资助项目(CARS-10-P14); 国家科技支撑项目(2012BAD06B02)。

作者简介: 邱彩玲(1976-), 女, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事马铃薯纺锤块茎类病毒及其检测技术的研究。

***通信作者(Corresponding author):** 吕文河, 教授, 主要从事马铃薯遗传育种和栽培生理研究, E-mail: luwenhe60@163.com; 白艳菊, 研究员, 主要从事脱毒马铃薯种薯质量检测技术研究及检测体系的建立, E-mail: yanjubai@163.com。

温处理等方法将其彻底脱除, 因此, 目前控制该病害的最主要方法是通过严格的检验检疫, 生产无毒种薯, 从源头上控制该病害的发生和传播。因此, 用于检验 PSTVd 的技术就成为了控制该病害的关键所在。

目前, 全世界普遍采用的检测 PSTVd 的方法有生物学方法(接种鉴定)、电子显微镜技术、往返-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Return-polyacrylamide gel electrophoresis, R-PAGE)、核酸斑点杂交(Nucleic acid spot hybridization, NASH)、逆转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和实时荧光定量 RT-PCR (Real-time Fluorescent Quantitative Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction, FQ RT-PCR)等, 这些检测方法都各有利弊, 我们应首先了解这些方法的特点, 然后根据自身条件等合理地选择检测方法, 更好地控制马铃薯脱毒种薯和种苗的质量。

1 检测技术

1.1 生物学方法

传统的生物学鉴定方法是以植物病原在寄主上的表现症状作为识别病害和鉴定病原的基础。该方法一般分为目测法和指示植物法两种, 前者主要利用病原在寄主上的症状来区别寄主是否受到感染, 指示植物法则是利用一些模式植物上出现的特征来鉴别是否存在病原感染的方法。1964年, Raymer等^[1]利用番茄作为 PSTVd 的指示植物进行 PSTVd 鉴定, 该方法是利用生物学方法检测 PSTVd 最基本、最早的方法。大体做法是在番茄长到两片真叶时, 在 27~30℃, 10 000 Lx 光照下进行接种, 接种后 2~4 周或更长时间, 观察植株表现, 感染 PSTVd 的植株一般会出现矮化, 顶部新生叶片变小, 扭曲, 粗缩, 下卷, 叶片淡绿色, 逐渐发生中脉和支脉坏死等症状。利用该方法还可鉴定 PSTVd 株系致病性的强弱, 目前仍然是研究 PSTVd 及其相关领域不可或缺的基本方法。但该方法具有诸多缺点, 如鉴定周期长, 受温度、光照等环境条件影响大等, 对于不同品种和环境有不同的表现, 并且还存在潜伏侵染等情况, 因此, 此方法一般不适用于日常检测。

1.2 电子显微镜技术

20 世纪 70 年代, Sogo 等^[2]就利用电子显微镜对

PSTVd 进行了检测和观察, 从而确定了 PSTVd 的形态和大小等信息, 为 PSTVd 的相关研究工作打下了坚实的基础。该方法具有快速、简单、直接等优点, 但是, 该方法需要一定的专业电镜操作技能, 且电子显微镜体积庞大, 要求高, 需要专门的实验室安放, 价格昂贵, 一般的实验室不具备该设备, 因此, 不适用于大面积推广用于日常 PSTVd 检测。

1.3 往返电泳法

一些研究者利用 R-PAGE 成功检测 PSTVd^[3, 4], 该方法后来被广泛应用于 PSTVd 的检测。该方法克服了生物学方法需要周期长, 受环境影响大的缺点, 同时不需要像电子显微镜那样的设备, 在一段时间内得到了广泛的应用。之后又对该方法进行了改进, 使之可根据 PSTVd 电泳迁移率来鉴定 PSTVd 的致病性。目前, 该方法仍在一定范围内应用。然而, 虽然该方法克服了以往检测技术的诸多缺点, 但该技术仍然存在一定的不足, 如检测灵敏度低, 一次性检测样品量小等, 不适用于大量样品的检测。

1.4 核酸斑点杂交

随着生物技术突飞猛进的发展, 越来越多的生物技术可以被应用于 PSTVd 的检测, 国内外很多学者都开始应用 NASH 检测 PSTVd^[5-7]。此法基于互补碱基的结合, 因而可靠、灵敏度高。1989 年以后, ³²P 和生物素先后被应用于 cDNA 探针的标记^[8, 9], 但是, ³²P 半衰期短, 有放射性危害, 对操作及废物处理要求严格, 而生物素成本较高, 因此, 这两种方法都没有广泛普及。1992 年, 何小源和周广和^[10]用光敏生物素标记了 PCR 扩增后的 PSTVd-cDNA 探针。1997 年, 董江丽等^[11]用长臂光敏生物素标记 cDNA 探针, 克服了之前的一些弊端, 使该技术更具实用性。2009 年, 邱彩玲等^[12]利用地高辛标记的探针及其核酸斑点杂交检测 PSTVd 试剂盒的成功研制为核酸斑点杂交法检测 PSTVd 开拓了更为简便的途径。经过诸多学者的共同努力, 现在利用 NASH 方法检测 PSTVd 已经变得非常简便, 一次可以检测大量样品, 灵敏度高, 操作简单, 对环境友好, 对操作人员没有危害, 是日常检测 PSTVd 非常便利且有效的方法。

1.5 逆转录-聚合酶链式反应

RT-PCR 是指在对类病毒 RNA 基因组进行扩增之前需要先用逆转录酶(Reverse transcriptase)在引物的引导下先合成与类病毒基因组互补的 DNA

(Complementary DNA, cDNA), 然后进行PCR扩增的方法。该方法具有灵敏度高的优点, 但是, 非特异性扩增是RT-PCR方法原理上的缺陷, 容易受到试剂、引物等的污染而出现假阳性, 因此检测结果往往不可靠, 但是对于类病毒的基因组序列分析却非常重要。

1.6 实时荧光定量RT-PCR

FQ RT-PCR是检测低丰度RNA的敏感方法, 该方法是在RT-PCR基础上发展起来的一种灵敏度较高的核酸定量技术, 该技术已经被成功的用于检测植物病毒和马铃薯纺锤块茎类病毒类病毒。这种方法检测灵敏度高, 且可以定量。然而, Real-time PCR仪及相关的试剂和耗材价格昂贵, 检测成本非常高, 而且对于种薯和种苗质量检测来讲, 并不需要知道其感染PSTVd的浓度, 只需要知道感染与否即可, 因此, 此方法一般不用于日常检测, 仅适于有特殊要求或者非常重要的资源的检测。

除上述几种常见的检测方法以外, 还有基因芯片、寡核苷酸微点阵技术等, 只是这些方法目前普及率比较低。

2 如何选择合适的检测技术

对于种薯和种苗生产者来说, 为了生产合格的脱毒种薯和种苗, PSTVd是必须要检测的一个重要参数。那么, 面对众多的检测技术和方法, 我们应该如何选择符合自己需要的检测技术呢? 以下几方面是要重点考虑的因素。

2.1 检测目的及要求

检测目的和要求是我们首先要考虑的问题, 对于即将用于扩繁的种苗来讲, 此阶段需要检测的样品数量少且尤为重要, 因此, 在条件允许的情况下, 应尽可能选择灵敏度较高的技术, 以确保扩繁种苗的质量, 避免后期造成无法挽回的损失。如果是已经扩繁到很多种苗或者进行田间大范围检测, 适宜采用灵敏度较高且一次可以检测大量样品的方法, 如NASH, 这样既可保证灵敏度, 又可节约人力物力, 提高工作效率, 节约成本。

2.2 实验设施及经费条件

在选择检测技术的时候, 实验条件和设施是必须考虑的因素之一, 不同的检测方法需要不同的设备, 要全方位考虑问题, 作出适当的选择, 在保证

检测质量的同时尽可能减少不必要的经费支出。

当然, 上述参考意见仅考虑技术层面等相关的问题, 并没有涉及法律、法规等因素, 因此, 种薯和种苗生产者还应深入学习相关的法律法规, 熟悉各种相关的标准和技术规程, 在确保种薯、种苗质量的同时, 合理地保护自己和他人的合法利益。

[参 考 文 献]

- [1] Raymer W B, O' Brien M J, Merriam D. Tomato as a source of an indicator plant for the potato spindle tuber virus [J]. Amer Potato J, 1964, 41:311-314.
- [2] Sogo J M, Koller T, Diener T O. Potato spindle tuber viroid: X. Visualization and size determination by electron microscopy [J]. Virology, 1973, 55(1): 70-80.
- [3] Schumann G L, Thurston H D, Horst R K. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of potato spindle tuber viroid in potato [J]. Phytopathology, 1978, 68: 1256-1259.
- [4] Pfannenstiel M A, Slaok S A, Lane L C. Detection of potato spindle tuber viroid in field-grown potatoes by an improved electrophoretic assay [J]. Phytopathology, 1980(70): 1015-1018.
- [5] Barker J M, McInnes J L, Murphy P J, *et al.* Dot-blot procedure with (³²P) DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in plants [J]. Virol Meth, 1985, 10: 87-98.
- [6] Maule A J. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues [J]. Virol Meth, 1983, 6: 215-224.
- [7] 吕典秋, 李学湛, 白艳菊, 等. NASH技术和R-PAGE技术在马铃薯类病毒检测上的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(1): 15-18.
- [8] 曹先维, 张鹤玲. 用³²P-cDNA探针核酸斑点杂交鉴定PSTV [C]. 中国马铃薯和甘薯合作研究进展, 1986-1989. 1989: 71-78.
- [9] 张鹤龄, 曹先维, Ilse Balbo, 等. 用生物素标记cDNA探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 病毒学报, 1989, 5(1): 72-75.
- [10] 何小源, 周广和. 应用聚合酶链式反应扩增和光敏生物素标记的cDNA探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 病毒学报, 1992, 8(4): 337-341.
- [11] 董江丽, 哈斯阿古拉, 张彤, 等. 用长臂光敏生物素标记的cDNA探针核酸斑点杂交检测马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 1997, 28(4): 537-540.
- [12] 邱彩玲, 刘尚武, 王绍鹏, 等. 马铃薯类病毒的危害及NASH检测试剂盒的研制 [M]//. 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.