

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2013)04-0239-04

马铃薯病毒的常用检测方法

刘玲玲*, 韩黎明, 张尚智, 禹娟红

(定西师范高等专科学校生化系, 甘肃 定西 743000)

摘要: 目前常用马铃薯病毒检测的方法, 主要包括寄主生物学检测法、抗血清检测法、电子显微镜检测法、酶联免疫检测法和分子生物学检测法。重点讨论了分子生物学方法中的各种 RT-PCR 方法。同时对各种方法的优缺点进行了比较, 并总结出将传统生物学检测技术、免疫学检测技术和分子生物学检测技术相结合必将成为检测植物病毒最经济有效的手段。

关键词: 马铃薯病毒; 检测方法; 统计; 分析

Common Test Methods for Potato Virus Detection

LIU Lingling*, HAN Liming, ZHANG Shangzhi, YU Juanhong

(Department of Biochemistry, Dingxi Teachers College, Dingxi, Gansu 743000, China)

Abstract: The common test methods for potato virus detection were reviewed, including host biology detection, antiserological detection assay, electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay and molecular biological detection assay, with emphasis on the various RT-PCR methods of molecular biology methods. At the same time, the merit and demerit were compared with different methods, concluding that the combination of traditional biological detection, immunological detection and molecular biology detection technology would be the most cost-effective means for detection of plant viruses.

Key Words: potato virus; detection method; statistic; analysis

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.), 是世界上种植和食用国家最多的作物之一^[1]。马铃薯是以无性繁殖为主的作物, 很容易感染病毒, 当病毒侵入马铃薯体内以后, 主要通过改变马铃薯细胞的代谢途径, 使马铃薯正常的生理机能受到干扰和破坏, 导致马铃薯发生病毒病。马铃薯病毒病是影响马铃薯产量和品质的主要病害, 目前已报道的感染马铃薯的病毒多达 35 种, 类病毒 1 种, 其中分布广泛、危害严重的马铃薯病毒有马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 A 病毒(PVA)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)和马铃薯 M 病毒(PVM)等^[2]。同时多种病毒可复合感染, 加重了危害程度。但是由于马铃薯病毒病缺乏有效的防治药剂, 病毒病可继代相传, 从而导致种薯退化, 商品薯降

低甚至绝产, 造成严重的经济损失^[3]。

自从植物发现病毒以来, 国内外的科学家们都在努力地寻找着适合某种病毒相对应的检测方法, 随着科学技术的进步, 各种检测病毒的方法相继问世。

1 寄主生物学检测法

传统的生物学测定方法是以植物病毒在寄主上的表现症状作为识别病害和检测病毒的基础。寄主生物学检测法主要包括直观检测法和指示植物检测法两种。

1.1 直观检测法

直观检测法是根据病毒在马铃薯植株上的表现症状来判断感病情况, 即根据植株茎叶是否表现出某种病毒所特有的可见症状来确定病毒感染程度。

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 定西师范高等专科学校校级科研项目(1316)。

作者简介: 刘玲玲(1977-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。

* 通信作者(Corresponding author): 刘玲玲, E-mail: llliu112@163.com。

1.2 指示植物检测法

指示植物检测法最早是由美国的病毒学家 Holmes^[4]在 1929 年发现的。指示植物又称鉴别寄主,

指的是对某种或某些特定病毒非常敏感, 被感染后症状表现十分明显的植物。常用的几种马铃薯病毒的指示植物^[5](见表 1)。

表 1 几种马铃薯病毒的指示植物及其感病症状
Table 1 Indicator plants and symptoms of some potato viruses

病毒种类 Virus	指示植物 Indicator plant	症状 Symptom
马铃薯 X 病毒(PVX)	千日红, 曼陀罗, 辣椒, 番茄, 心叶烟	脉间花叶
马铃薯 S 病毒(PVS)	苋色藜, 千日红, 光曼陀罗, 昆诺阿藜	叶脉深陷粗缩
马铃薯 Y 病毒(PVY)	野生马铃薯, 洋酸菜, 曼陀罗	轻微花叶或粗缩, 敏感品种坏死

从受检马铃薯植株上取下叶片或者其他组织并研磨, 通过摩擦或者媒介昆虫将汁液接种到寄主植物上使其细胞受到侵染, 经过一段时间后指示植物即可表现症状, 通过观察指示植物所表现出来的相应症状来检测马铃薯内有无病毒以及带何种病毒。2003年, 吴凌娟等^[6]用多种指示植物分离鉴定PVX, 结果表明千日红是一种很好的鉴定指示植物, 因其发病时间短, 易观察。指示植物检测法对于大批马铃薯试管苗生产的检测不适用, 但在 PVX、PVY、PVS 等病毒株系检测上用的比较多^[7], 并广泛应用于分子生物学或血清学检测之前的初步鉴定。

寄主生物学检测法是进行病毒检测常用的一种方法, 也是进行植物病毒诊断检测的重要依据。但是, 单独使用此法存在着一定的局限性, 一方面有些病毒在寄主植物上并不表现明显的可见症状, 或是只有经过相当长时间才能表现可见症状; 另一方面由于田间病毒病症状易受到病毒种类和株系、寄主品种和生育期、气候及环境条件的影响而发生变化。但是, 作为认识植物病毒的基础, 寄主反应的生物学意义仍然无法替代。把病毒的寄主生物学方法和分子生物学方法有效结合将为更好地认识植物病毒提供新的研究系统^[8]。

2 抗血清检测法

植物病毒是由核酸和蛋白质组成的核蛋白, 因而是一种较好的抗原, 给动物注射后会产生抗体, 这种抗原和抗体结合会引起血清凝集或沉淀反应, 即抗原和抗体之间发生的高度专一的免疫反应, 借助这种反应就可用已知病毒的抗血清鉴定未知病毒的种类。这个过程在很短时间内即可完成, 因此病毒的抗血清检测法既灵敏又快捷, 是目前常用的一

种病毒检测方法。

3 电镜检测法

自从 Kausche 等^[9]首次在电镜下看到烟草花叶病毒(TMV)以后, 电镜检测法已成为植物病毒研究必不可少的常规手段之一。电镜技术是通过观察植物病毒颗粒形态、大小、结构、内含体组成形状和亚结构等方面的特征来确定病毒的存在和种类。现代电镜的分辨率可达到 0.5 nm, 因此利用电镜观察, 比生物学检测更直观, 而且速度更快。目前运用的电镜负染技术和超薄切片技术观察能够诊断和检测植物病毒。超薄切片技术尤其对一些未知病毒, 难于提纯的病毒材料, 负染技术不能解决的检测材料都可进行, 通过对组织细胞的直接观察而得到解决, 因此在病毒学检测和脱毒快繁的实际生产中均有着特殊的重要性和不可取代的作用^[10]。

4 酶联免疫吸附检测法

酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是把抗原-抗体的免疫反应与酶的催化反应相互结合而发展起来的一种综合性技术。自 Casper^[11]应用 ELISA 方法鉴定了 PLRV 病毒后, 这一技术在马铃薯病毒检测中得到了应用。经不断改进和提高, 目前已形成间接 ELISA、双抗体夹心法(DAS-ELISA)、三抗体夹心法(TAS-ELISA)、异种动物抗体夹心法、A 蛋白酶联法、点免疫结合技术(Dot-ELISA, DIBA) 等多种测试方法^[12]。2000 年, 白艳菊等^[13]通过改进应用快速 DAS-ELISA 法对 5 种马铃薯病毒 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 同时检测。2006 年, 宋吉轩等^[14]分别用改进 DAS-ELISA 法和常规 DAS-ELISA 法检测 PVX、PVY、PVS、PLRV

4种马铃薯病毒, 显示出直观、实用、快速、准确可靠、灵敏度高等优点。目前TAS-ELISA技术应用于马铃薯病毒检测的不多^[1]。张仲凯等^[15]用TAS-ELISA检测了马铃薯脱毒苗, 并做了几种检测方法的比较, 结果表明TAS-ELISA的灵敏度远高于DAS-ELISA的灵敏度。2006年, 刘成科等^[16]用TAS-ELISA检测了百合无症病毒, 其灵敏度也高于DAS-ELISA和间接ELISA。DIBA既可采用直接ELISA, 也可采用间接ELISA进行检测, 通常间接灵敏度要高于直接法。

5 分子生物学检测法

传统的生物学病毒检测法灵敏度低, 且费时费力, 以病毒为基础的抗血清和酶联免疫检测法虽然灵敏度有所提高, 但仍不能很好地检测含量极少的韧皮部病毒及休眠种薯中的病毒^[17]。分子生物学检测法从核酸水平检测病毒, 因而灵敏度高、特异性强, 能克服血清学及其他检测方法中的一些缺点, 可以进行大批量的样本检测, 是目前发展最快、且最有发展前景的病毒检测技术^[18]。

5.1 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测法

PCR是一种体外扩增DNA技术, 常规PCR可检测植物DNA病毒, RT-PCR可检测植物RNA病毒。大多数植物病毒为RNA病毒, 需要将RNA反转录成cDNA再进行PCR反应, 此方法称为RT-PCR^[1]检测法。2005年, 关翠萍等^[19]用一步RT-PCR法对马铃薯中的PVX、PVY和PLRV做了检测, 由此提出了马铃薯病毒一步法RT-PCR检测技术。袁青等^[20]用二重RT-PCR快速检测PVY和PLRV, PVX和PVA的混合病毒, 结果表明, 此法适用于大量样品的快速制备, 并为马铃薯病毒病的早期诊断提供了一定的依据。陈阳婷等^[21]运用三重RT-PCR快速检测法对马铃薯中的多种复合感染病毒(PVX、PVS和PVA; PVX、PVS和PLRV; PVX、PVA和PLRV; PVS、PVA和PLRV)进行检测, 建立了三重RT-PCR检测技术。代廷非^[22]运用多重RT-PCR技术检测了马铃薯的多种病毒。多重RT-PCR技术可同时检测几种病毒, 节约时间并提高了工作效率^[23]。

5.2 指示分子NASBA检测法

该检测法是以RNA转录为基础的等温扩增法, 适用于RNA病毒的扩增, 一般可通过分子杂交判断扩增结果, 也可在有双链DNA存在的情况下实现对单链RNA的特异扩增, 具有高度的特异性^[24]。目前

此法可以对多种不同类病毒甚至同一类病毒的不同株系进行同时检测^[25,26]。

5.3 核酸杂交检测技术

核酸杂交技术是指具有互补序列的两条单链核酸分子在一定条件下按碱基互补配对原则退火形成双链的过程。杂交的双方是待测核酸和已知核酸序列, 将已知核酸序列制成含有某种标记的探针, 再与互补的待测样品核酸杂交, 带有探针的杂交核酸能指示病原的存在。目前有核酸斑点杂交技术(Nucleic acid spot hybridization, NASH)和PCR微量板杂交检测技术两种。1983年, Maule等^[27]报道了应用NASH检测病毒。1993年, Querci^[28]用该方法成功的检测了PVX不同分离株系。但是NASH也存在一定的缺点, 比如在检测大量样品时, 探针的分离比较困难。而且在检测休眠种薯中的病毒时, 检测灵敏度还不高, 尤其对于PVY和PLRV两种病毒^[29]。

6 结 论

以上所归纳总结的几种方法都是马铃薯病毒检测的常用方法, 每种方法都有其各自的优缺点, 如传统生物学检测技术准确、直观、易于操作, 但耗时长, 已经远不能适应生产的需要。抗血清检测法快速、灵敏, 适于大规模样品的检测, 但是在抗血清的制备上存在着很多不足。但在生产实践中, 具体使用哪一种检测方法就要根据病毒的不同类型, 技术掌握程度, 设备等具体条件的不同, 选择最适宜的检测方法。

随着分子生物学技术的不断改进和完善及相关仪器的普及推广, 分子生物学的检测技术势在必行, 但是也存在着很多缺点, 所以将传统生物学检测技术、免疫学检测技术和分子生物学技术相结合必将成为最经济有效的检测手段。

[参 考 文 献]

- [1] 毛彦芝. 马铃薯病毒检测技术的研究概况[J]. 中国蔬菜, 2009 (12): 1-6.
- [2] 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.
- [3] 王文重, 张抒, 于德才. 马铃薯病毒分子检测技术研究进展[J]. 中国马铃薯, 2009, 23 (1): 40-43.
- [4] Holmes F O. Local lesions in tobacco mosaic [J]. Bot Gaz, 1929, 87: 39-70.

- [5] 李浚明, 朱登云. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [6] 吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 等. 用指示植物分离鉴定马铃薯轻花叶病毒(PVX)的技术[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(2): 82-83.
- [7] 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): 73-74.
- [8] 谷宇. 马铃薯病毒与类病毒检测芯片的制备及应用[D]. 江苏: 东南大学, 2004: 1-6.
- [9] Kausche G A, Pfankuch E, Ruska H. Die sichtbarmachung von pflanzlichem virus im ubermikroskop [J]. Naturwissenschaften. 1939, 27: 292-299.
- [10] 马筠. 植物病毒鉴定检测方法的研究进展[J]. 世界农业, 2003 (8): 50-51.
- [11] Casper R. Detection of potato leafroll virus in potato and in *Physalis floridana* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [J]. J Phytopathol, 1977, 90: 364-368.
- [12] 张洪波, 肖启明, 李小娟. 酶联免疫吸附反应(ELISA)在烟草病毒病检测中的应用[J]. 江西植保, 2006, 29(4): 158-162.
- [13] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 143-144.
- [14] 宋吉轩, 范士杰, 董颖苹, 等. 应用改进的 DAS-ELISA 法快速检测马铃薯病毒[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(5): 69-70.
- [15] 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(S): 121-130.
- [16] 刘成科, 吴建祥, 洪健. 单抗 I-ELISA 和 TAS-ELISA 检测百合无症病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 301-305.
- [17] Hadidi A, Montasser M S, Levy L, *et al.* Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteo-viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification [J]. Plant Disease, 1993, 77: 595-601.
- [18] 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.
- [19] 关翠萍, 张鹤岭, 门福义, 等. 马铃薯病毒一步法 RT-PCR 诊断研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2005, 36(2): 178-185.
- [20] 袁青, 殷幼平, 王中康, 等. 二重 RT-PCR 快速检测马铃薯病毒的方法[J]. 植物检疫, 2005, 19(3): 135-138.
- [21] 陈阳婷, 宁红, 张敏, 等. 三重 RT-PCR 快速检测多种马铃薯病毒的研究[J]. 湖南农业科学, 2010(11): 75-77.
- [22] 代廷非. 多重 RT-PCR 技术检测马铃薯病毒的研究[D]. 四川: 四川农业大学, 2011.
- [23] Singh R P, Nie X. Multiple virus and viroid detection and strain separation via multiplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Plant Pathol, 2003, 25: 127-134.
- [24] 王文重, 张抒, 于德才. 马铃薯病毒分子检测技术研究进展[J]. 中国马铃薯, 2009, 23 (1): 40-43.
- [25] Klerks M M, Leone G O, Verbeek M, *et al.* Development of a multiplex Ampli Det RNA for the simultaneous detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers [J]. J Virol methods, 2001, 93(1): 115-125.
- [26] Szemes M, Klerks M M, van den Heuvel J F, *et al.* Development of a multiplex Ampli-Det RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates [J]. J Virol Methods, 2002, 100(2): 83-96.
- [27] Maule A J, Hull R, Donson J. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues [J]. J Virol Methods, 1983, 6(4): 215-224.
- [28] Querci M. Molecular characterization of potato virus X: development of detection probes and identification of the resistance breaking capacity of strain HB [D]. The Netherlands: Wageningen Agricultural University, 1993.
- [29] Singh M, Singh R P, Moore L. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in the dormant tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants [J]. Amer J of Potato Res, 1998, 76(2): 61-66.

公 示

2013 年中国马铃薯大会期间, 中国作物学会马铃薯专业委员会决议通过新增补委员 15 人, 团体会员单位 1 个, 现将名单公布如下:

新委员 15 人: 陈勤(陕西)、罗文彬(福建)、张招娟(福建)、仲乃琴(北京)、夏精魁(黑龙江企业)、张丽娟(黑龙江)、王中美(湖南)、郑太波(陕西)、宋玉合(内蒙古企业)、王立军(内蒙古企业)、张新永(云南)、王立春(黑龙江)、纳添仓(青海)、曹春梅(内蒙古)、刘富强(内蒙古)。

新团体会员单位 1 个: 西北农林科技大学马铃薯种质资源创新研究中心(陕西)。

中国作物学会马铃薯专业委员会
2013 年 7 月 16 日于重庆市巫溪县