

湖南省马铃薯主产区马铃薯病毒种类及流行分析

胡新喜^{1,2}，雷 艳^{1,2}，何长征^{1,2}，刘明月^{1,2}，李炎林¹，宋 勇^{1,2}，
黄 科^{1,2}，秦玉芝^{1,2}，熊兴耀^{1,2*}，Nie Xianzhou^{3*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院，湖南 长沙 410128；2. 湖南省马铃薯工程技术研究中心，湖南 长沙 410128；
3. Potato Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 850 Lincoln Road, P. O. Box 20280, Fredericton, NB E3B 4Z7, Canada)

摘 要：马铃薯是世界第四大粮食作物，其病毒病危害严重。2010 年对湖南马铃薯主产区采集的 66 个病毒标样进行了 RT-PCR 检测，结果表明，检测出的马铃薯病毒有马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)、马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯 A 病毒(PVA)和马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)。其中 PVS 的检出率最高，为 54.5%，其次是 PVX，检出率为 45.5%，PVY 的检出率为 39.4%，PSTVd 和 PVA 的检出率均为 21.2%，PLRV 的检出率为 18.2%。2~4 种病毒的复合侵染现象较为普遍。PVY 中重组型 PVY 占 85.7%。

关键词：马铃薯；病毒种类；流行；RT-PCR

Species and Epidemiology of Virus in Main Potato Regions in Hunan Province

HU Xinxi^{1,2}, LEI Yan^{1,2}, HE Changzheng^{1,2}, LIU Mingyue^{1,2}, LI Yanlin¹,

SONG Yong^{1,2}, HUANG Ke^{1,2}, QIN Yuzhi^{1,2}, XIONG Xingyao^{1,2*}, NIE Xianzhou^{3*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Hunan Potato Research Center, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Potato Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 850 Lincoln Road, P.O. Box 20280, Fredericton, NB E3B 4Z7, Canada)

Abstract: Potato is the world's fourth major food crop. Potato virus disease is one of the most serious diseases and causes the yield loss. Sixty-six virus samples of potato collected from main potato areas of Hunan province were identified with RT-PCR in 2010. The results showed that 6 kinds of main potato virus (viroid) including PVY, PLRV, PVX, PVS, PVA and PSTVd were detected. Their proportions were 54.5% (PVS), 45.5% (PVX), 39.4% (PVY), 21.2% (PSTVd and PVA) and 18.2% (PLRV), respectively. Moreover, 2-4 kinds of virus mixed infection were prevalent. among the PVY samples, the proportion of recombinant PVY was 85.7%.

Key Words: potato; virus; epidemiology; RT-PCR.

马铃薯适应性强，产量高，不仅粮菜兼用，还是优良的加工原料，可加工成薯片、薯条、淀粉和酒精等多种产品，用途广泛、产业链长。全球每年有近两千万吨淀粉原料直接投入工业生产，涉及食品、医药、纺织、化工及造纸业等众多工业领域，而用作工业原料的淀粉主要来自玉米和马铃薯。

目前全球马铃薯种植总面积约 1 900 万 hm²，总产量近 3 亿 t，仅次于水稻、小麦、玉米，位居第四。中国是世界第一大马铃薯生产国，种植面积占全球的 25%，总产约占全球的 20%。但是，马铃薯病害特别是病毒危害严重，给马铃薯生产带来很大的损失^[1]。

收稿日期：2012-07-30

基金项目：湖南省自然科学基金项目(11JJ2018)；湖南省高等学校科学研究项目(10A058)。

作者简介：胡新喜(1973-)，男，博士，湖南农业大学副教授，研究方向为马铃薯病毒学。

* 通信作者(Corresponding author)：熊兴耀，主要从事马铃薯栽培与土肥研究，E-mail: xingxy@hunau.net；Nie Xianzhou，主要从事马铃薯病毒学研究，E-mail: niex@agr.gc.ca。

马铃薯病毒能引起马铃薯种质退化, 产量降低, 最严重的减产达 90%以上^[1,2]。侵染马铃薯的病毒及类病毒约 40 种^[3], 但是危害严重的只有几种, 如马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)、马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA)、马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS)和马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)^[4]。这些病毒与类病毒在世界范围内普遍发生, 其中 PVY 和 PLRV 是感染马铃薯的病毒中最为广泛并造成严重经济损失的两种病毒。感染马铃薯的 PVY 分为普通型(Common or ordinary strain, PVY^O), 烟草叶脉坏死型(Tobacco vein necrosis strain, PVY^N), 马铃薯块茎环斑坏死型(Potato tuber ring spot necrosis, PVY^{NTN}), 点条斑型(Stipple streak strain, PVY^C)及 PVY^Z和 PVY^{HS-7}。

湖南省是我国南方冬作马铃薯主产区, 常年栽培面积在 13.3 万 hm² 左右。由于湖南省大部分种植户的种植面积较小, 有自己留种习惯或在市场上购买商品薯做种薯, 种薯质量较差, 但对其病毒病流行情况缺乏较为系统的调查和研究。为了摸清湖南省马铃薯病毒的种类和其发生规律, 有效控制马铃薯病毒病, 为此, 2010 年作者对湖南马铃薯主产区的病毒病进行了系统的调查研究。

1 材料与方法

1.1 材料

供鉴定的马铃薯样品来自湖南的主产区(湘西自

治州龙山、永顺、益阳资阳区和常德澧县、长沙市芙蓉区等), 2010 年在马铃薯大田生长季节(4~5 月)在上述产区田间植株上采集到病毒标样 66 个, 针对马铃薯病毒植株典型症状: 花叶、矮化、皱缩等症状, 进行采样, 不采具有明显卷叶症状的植株材料, 采取幼嫩叶片, 编号, 用塑料袋分别包装, 放入保温冰盒中, 拿到实验室后-80℃冷藏, 保存备用; 同时每个样品采马铃薯块茎 1~2 个, 也叶片样品对应编号, 以便进行进一步研究。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

采用天根生物公司的 Trizol 试剂盒提取 RNA。

1.2.2 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

用六碱基随机引物将 0.5 μg 上述 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 分别进行三重(检测 PVS、PVX 和 PLRV)、双重 PCR(检测 PVA 和 PVY)和单重 RT-PCR(检测 PSTVd), 检测 6 种主要病毒和类病毒, PCR 引物设计参照 Nie 和 Singh^[8]以及 Bostan 等^[9]的方法。用三重 RT-PCR 检测病毒样品中重组型 PVY^{N:O}和 PVY^{NTN}的比例, PCR 引物设计参照 Nie 和 Singh 的方法^[10,11]。引物由上海生物工程公司合成(表 1)。

RT 反应体系: 5× RT buffer 2 μL, 0.1 M 的 DTT 1 μL, 100 μg/L 的 RT 反向引物 0.5 μL, 5 mM 的 dNTPs 2 μL, RNasin 酶 10 U, M-MLV RT 酶 100 U, 超纯水补至 7.5 μL。

反应程序: 0.2 μg/μL 的 RNA 2.5 μL 65℃ 变性 8 min, 冰浴 3 min, 加 7.5 μL 的 RT 反应体系, 42℃

表 1 RT-PCR 检测几种病毒的引物

Table 1 Primers for RT-PCR detection of potato virus

病毒/类病毒 Virus or viroid	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	片段大小(bp) Fragment size (bp)
Potato virus S	5'-TGGCGAACACCCGAGCAAATG-3'	5'-ATGATCGAGTCCAAGGGCACTG-3'	187
Potato virus A	5'- GTTGGAGAATTCAGATCCTGG-3'	5'-TTTCTCTGCCACCTCATCG -3'	255
Potato leafroll virus	5'- CGCGCTAACAGAGTTCAGCC-3'	5'-GCAATGGGGGTCCAACCTCAT -3'	336
Potato virus Y	5'-ACGTCCAAAATGAGAATGCC-3'	5'-TGGTGTTCGTGATGTGACCT-3'	480
Potato virus X	5'-TAGCACAACACAGGCCACAG-3'	5'-GGCAGCATTTCATTTCAGCTTC-3'	562
Potato spindle tuber viroid	5'- ATTAAT CCCCCG GGA AACCTG GAG-3'	5'-AGC TTCAGTTGT TTCCACCGGCT -3'	200
Potato virus Y (NTN 或 N:O)	5'-CAT GAT GGA TCT GGC TAC A -3'	5'- AGT GGG GTA CGT TAG ATG TAG G-3'	641
Potato virus Y(NTN)	5'- GAT CTC AAG TTG AAG GGG AC-3'	5'- TTG CGG ACA TCA CTA AAG CG -3'	448
Potato virus Y(NTN)	5'- CGT AAT CTG CGC GAT GGA A-3'	5'- GCC ACT GCA TAT GTA AAT ACT-3'	290

水浴至少 1 h, 95°C 温浴 2 min 终止反应, 获得 cDNA 产物。

PCR 反应体系: 不含 Mg²⁺ 的 10×buffer 2.5 μL, 100 μg/L 的正、反向引物各 0.5 μL, 5 mM 的 dNTPs 1 μL, 25 mM 的 MgCl₂ 1.5 μL, Taq 酶 1 U, cDNA 2 μL, 超纯水补至 25 μL。

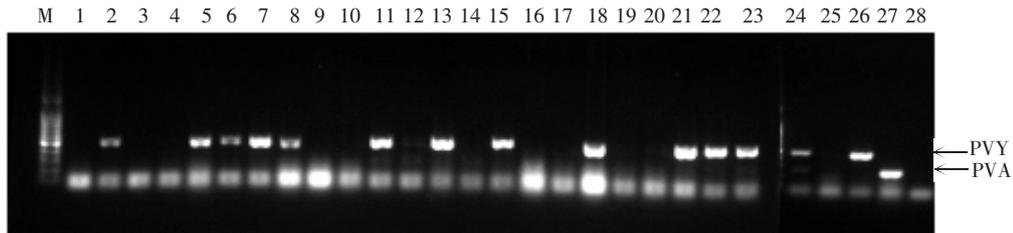
PCR 扩增程序: 92°C 5 min 预变性后, 30 个 PCR 循环参数为: 95°C 30 s, 56°C 5 个循环 30 s, 54°C 5 个循环 30 s, 52°C 10 个循环 30 s, 50°C 10 个

循环 30 s, 72°C 60 s, 最后 72°C 10 min。

2 结果与分析

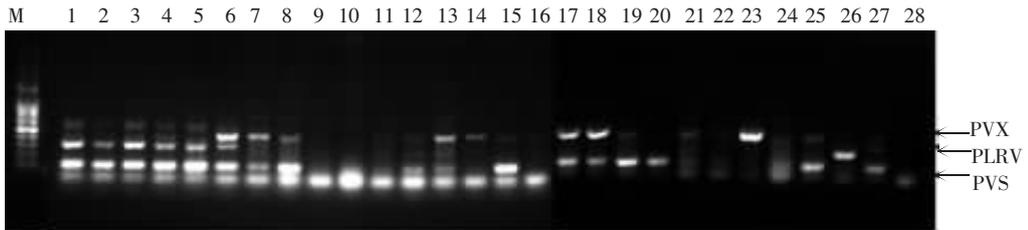
2.1 病毒种类

结果表明, 6 种主要病毒均被检测出来(图 1、图 2、图 3), PVS 的检出率最高为 54.5%, 其次是 PVX, 检出率为 45.5%, PVY 的检出率为 39.4%, PSTVd 和 PVA 的检出率均为 21.2%, PLRV 的检出率为 18.2%(表 2)。由于采样时不采具有明显卷叶症



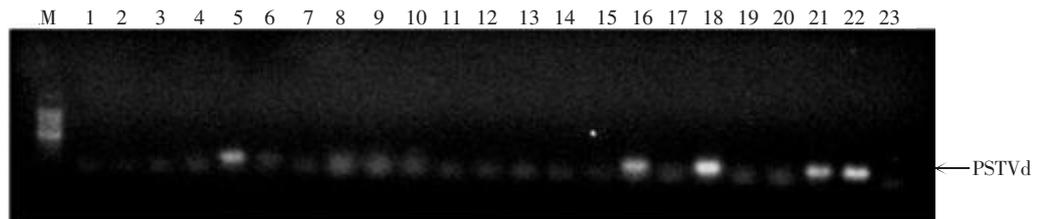
M: DNA ladder; 1-25: 样品; 26-27: PVY 和 PVA 的阳性对照; 28: 阴性对照。
M: DNA ladder; 1-25: Samples collected from Hunan province; 26-27: PVY and PVA positive control; 28: virus-free sample.

图 1 二重 RT-PCR 检测 PVY 和 PVA
Figure 1 Duplex RT-PCR detection of PVY and PVA



M: DNA ladder; 1-25: 样品; 26-27: PLRV 和 PVS 的阳性对照; 28: 阴性对照。
M: DNA ladder; 1-25: Samples collected from Hunan province; 26-27: PLRV and PVS positive control; 28: virus-free sample.

图 2 三重 RT-PCR 检测 PVX、PLRV 和 PVS
Figure 2 TriPlex RT-PCR detection of PVX, PLRV and PVS



M: DNA ladder; 1-21: 样品; 22: PSTVd 的阳性对照; 23: 阴性对照。
M: DNA ladder; 1-21: Samples collected from Hunan province; 22: PSTVd positive control; 23: viroid-free sample.

图 3 RT-PCR 检测 PSTVd
Figure 3 RT-PCR detection of PSTVd

表 2 RT-PCR 检测马铃薯病毒与类病毒的检出率

Table 2 Potato virus and viroid infectious percentage in Hunan Province detected by RT-PCR

病毒 Virus	PVY	PLRV	PVX	PVA	PVS	PSTVd
检出率(%)Detection rate (%)	39.4	18.2	45.5	21.2	54.5	21.2

状的材料, 所以 PLRV 的检出率偏低。此外, 除湘西龙山县发现的 PVA 为单种病毒侵染外, 其余的全部为 2~4 种病毒的复合侵染。

2.2 PVY 株系种类

PVY 的株系种类较多, 对病毒材料进行进一步的 RT-PCR 检测发现, 检测出 PVY 的材料中重组型 PVY 占 85.7%, 具有 1 个或多个 PVY⁰ 和 PVY^N 的重组位点, PVY^{N:0} 占 21.4%, PVY^{NN} 占 64.3%, 其他的为 PVY⁰ 或 PVY^N, 占 14.3%, 其分型还有待进一步研究。可见, 湖南流行的 PVY 以重组型 PVY 为主, 特别是 PVY^{NN}。PVY^{NN} 不仅危害马铃薯的地上部分, 对产量造成损失, 而且能在马铃薯生长或块茎贮存过程中诱导马铃薯块茎发生坏死症状, 使马铃薯块茎的质量受到影响, 危害更为严重。

3 讨 论

湖南地处亚热带低纬度地区, 具有反季生产马铃薯的季节优势和地域优势。由于湘西高山地区全年绝大部分时间可立体种植马铃薯, 马铃薯的一部分用作种薯, 高山种植马铃薯蚜虫和病毒危害一般较轻, 而其他主产区的马铃薯种薯多为北方生产或市场上的商品薯, 因此病毒病的发生较湘西产区严重。研究表明, 湖南省主产区病毒 (类病毒) 主要有 PVS、PVX、PVY、PSTVd、PVA 和 PLRV。湖南流行的 PVY 以重组型 PVY 为主, 特别是 PVY^{NN}。2009 年作者等在湖南发现了 6 个 PVY 分离物, 经研究均为重组型 PVY^{NN}, 获得了 HN1 和 HN2 两个株系其全长基因序列, 分析了其分子特征、血清学特征和病理特征, 并建立了生物学、血清学和 RT-PCR 的鉴定方法^{[12][13]}。湘西主产区马铃薯样品检测结果为单一的 PVA 侵染, 而常德、益阳、长沙产区的马铃薯感染了 PVS、PVX、PVY、PLRV、PVA、和 PSTVd, 其中 PVY、PLRV 对马铃薯的危害最为严重, 虽然 PVX 单独危害较轻, 但是 PVX 检出率高达 45.5%, 而且全部为复合侵染。

研究表明: PVX 和其他病毒复合侵染时, 危害

加重^[4]。因此, 随着南方冬作马铃薯种植面积不断扩大, 必须重视冬作马铃薯的种薯繁育及质量检测和监督, 提高脱毒种薯的普及率, 提高单位面积产量和商品薯质量, 使农民增产增收。

[参 考 文 献]

- [1] 胡新喜, 何长征, 熊兴耀, 等. 马铃薯 Y 病毒研究进展[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(5): 293-300.
- [2] 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, S1: 121-131.
- [3] Wang B, Ma Y, Zhang Z, et al. Potato viruses in China[J]. Crop Protection, 2011, 30: 1117-1123.
- [4] Solomon-Blackburn R M, Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches[J]. Heredity, 2001, 86: 17-35.
- [5] Riechmann J L, Laín S, García J A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology[J]. Journal of General Virology, 1992, 73: 1-16.
- [6] Blanco-Urgoiti B, Sanchez F, Perezde S R C, et al. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains[J]. Journal of General Virology, 1998, 79: 2037-2042.
- [7] Singh R P, Valkonen J P T, Gray S M, et al. Discussion paper: The naming of potato virus Y strains infecting potato[J]. Arch Virol, 2008, 153: 1-13.
- [8] Nie X, Singh R P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers[J]. J Virol Methods, 2001, 91: 37-49.
- [9] Bostan H, Nie X, Singh R P. An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids[J]. J Virol Methods, 2004, 116(2): 189-193.
- [10] Nie X, Singh R P. Evolution of North American PVY^{NN} strain Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination [J]. Virus Genes, 2003, 26: 39-47.
- [11] Nie X, Singh R P. Specific differentiation of recombinant PVY^{N:0} and PVY^{NN} strains by multiplex RT-PCR[J]. J Virol Methods, 2003, 113: 69-77.
- [12] Hu X, He C, Xiao Y, et al. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China[J]. Arch Virol, 2009, 154: 1303-1312.
- [13] Hu X, Nie X, He C, et al. Differential pathogenicity of two different recombinant PVY^{NN} isolates in *Physalis floridana* is likely determined by the coat protein gene [J]. Virology Journal, 2011, 8: 207.