

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)04-0213-04

野生马铃薯抗 PVY 材料的鉴定与筛选

黄美杰¹, 毛彦芝², 盛万民², 陈伊里^{1*}

(1. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院克山分院, 黑龙江 克山 161606)

摘要:通过人工接种的方法对 5 类野生马铃薯材料进行了马铃薯 Y 病毒(PVY)的抗性鉴定和筛选。它们对 PVY 抗性存在明显的差异, 其中 *Solanum stoloniferum* (SA2)×*S. stenotomum*(104)和 *S. stoloniferum* (SA5)×*S. stenotomum* (105)组合抗性最强, 属于抗病群体, *S. chacoense* ×*S. stenotomum*(103)组合属于中抗群体, *S. chacoense* ⊗(102)和 *S. demissum* ⊗(101)组合属于感病群体。并从中筛选出一批抗 PVY 的育种材料: 0 级抗性材料 108 份, 1 级抗病材料 56 份, 3 级抗病材料 94 份。

关键词:野生马铃薯; 马铃薯 Y 病毒; 抗性鉴定; 抗性筛选

病毒病是危害马铃薯的重要病害, 特别是马铃薯 Y 病毒(PVY), 马铃薯感染 PVY, 一般减产 50% 左右, 当其与 PVX 或 PVA 病毒复合侵染时, 减产可达 80%^[1]。PVY 不仅降低马铃薯的产量, 还严重影响马铃薯的品质, 是种薯退化的主要原因。而培育抗病品种是解决马铃薯病毒病最经济、最根本且有效的方法^[2]。

由于栽培品种缺乏高抗 PVY 的遗传基因, 仅凭品种间杂交很难培育出抗 PVY 新品种。据报道马铃薯野生种(*Solanum stoloniferum*, *S. chacoense*)及安第斯栽培种(*S. andigena*)中含有对 PVY 免疫或过敏的基因^[3]。马铃薯的野生资源十分丰富, 野生种中有许多宝贵的性状, 但目前有许多资源未被挖掘, 即使已经收集到的资源也未被育种者全面认识和利用, 在育种上利用的野生种仅是极少部分。因此对野生种材料进行抗 PVY 鉴定和筛选, 对抗马铃薯 Y 病毒育种具有重大意义^[2]。

本试验通过人工接种的方法对 5 类野生马铃薯材料进行了马铃薯 Y 病毒的抗性鉴定和筛选, 目的是获得可直接用于生产实践的抗 PVY 材料或获

得可供抗 PVY 育种利用的中间材料, 为马铃薯野生种种质资源的利用提供参考, 并对抗 PVY 材料的筛选及利用策略提供实践经验。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯材料为 5 个马铃薯野生种群体(表 1), 由黑龙江省农业科学院克山分院马铃薯育种室提供。

表 1 5 个马铃薯野生种群体

编号	母本	父本	组合类型	单株数(株)
101	野生种落果薯(<i>S. demissum</i>)	野生种落果薯(<i>S. demissum</i>)	<i>S. demissum</i> ⊗	45
102	野生种恰柯薯(<i>S. chacoense</i>)	野生种恰柯薯(<i>S. chacoense</i>)	<i>S. chacoense</i> ⊗	81
103	野生种恰柯薯(<i>S. chacoense</i>)群体	原始栽培种窄刀薯(<i>S. stenotomum</i>)群体的混合花粉	<i>S. chacoense</i> × <i>S. stenotomum</i>	90
104	野生种葡枝薯(<i>S. stoloniferum</i>)的一个株系。田间表现抗马铃薯 Y 病毒	原始栽培种窄刀薯(<i>S. stenotomum</i>)群体的混合花粉	<i>S. stoloniferum</i> (SA2) × <i>S. stenotomum</i>	69
105	野生种葡枝薯(<i>S. stoloniferum</i>)的另一个株系。田间表现抗马铃薯 Y 病毒	原始栽培种窄刀薯(<i>S. stenotomum</i>)群体的混合花粉	<i>S. stoloniferum</i> (SA5) × <i>S. stenotomum</i>	66

收稿日期: 2009-02-20

基金项目: 农业部公益性(农业)科研专项(nyhyzx07-006-1-1)。

作者简介: 黄美杰(1982-), 女, 硕士研究生, 从事马铃薯遗传育种研究。

* 通讯作者: E-mail: potato@mail.neau.edu.cn.

毒源为 2007 年马铃薯 Y 病毒病发生时期, 从黑龙江省马铃薯主产区之一的克山县马铃薯种植地区采集的 37 份具有马铃薯 Y 病毒典型症状的病叶标样, 经室内检测、鉴定选取只含有 PVY 病毒且病毒含量最高的一份病样, 经分离纯化后保存在黄苗榆烟上作为接种毒源。

1.2 试验方法

接种鉴定试验在黑龙江省农业科学院克山分院防虫网棚中进行。5 个群体都是用实生种子播种。各群体所需的实生种子于 2008 年 5 月初浸种, 待催芽后点播于育苗盘中, 在植株长到 2~3 片叶时移栽到 18 cm × 20 cm 口径的塑料钵中, 放置在防虫网棚里, 行距 50 cm, 株距 70 cm。所用基质为草炭土与马粪 1:1 混合。常规育苗管理。

1.2.1 接种方法

采用人工摩擦接种法。具体接种方法参考克山分院病毒室提供的马铃薯品种(品系)抗主要病毒鉴定方法。接种毒源来自 2007 年采集分离的马铃薯 Y 病毒, 保存在普通烟的试管苗上。含毒的黄苗榆试管苗种植在防虫温室里, 温度 20~28 °C, 自然光照, 约 2~3 周后采摘发病叶片, 1 g 鲜病叶加入 10 mL 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0), 捣碎后双层纱布过滤, 滤液立即用于接种^[4]。

当幼苗长至 6 片真叶时, 进行第一次接种, 间隔 10 d 后进行第二次接种。但是野生种 *S. demissum* 在生长到约 8 片真叶时就开始现蕾, 而现蕾后接种症状不明显, 所以本试验在 101 群体(*S. demissum* ⊗) 生长到第 3 片真叶展开时进行接种。

1.2.2 检测方法

在第一次接种后每隔 3 d 调查 1 次, 10 d 后进行第二次接种, 然后每隔 3 d 调查 1 次, 对有症状的植株, 要回接 A6, 待第二次接种 21 d 后, 对无症状或症状轻的植株进行血清学检测, 采用双抗体酶联免疫法(DAS-ELISA)。ELISA 检测结果用 PG3201 型酶联免疫检测仪, 在 490 nm 波长的吸光值(OD 值)表示, 以吸光值超过阴性对照 2 倍作为阳性反应。本试验需回接 A6 的植株较多, 因此采用了离体接种法。离体 A6 叶片接种 PVY 后, 放在 24 °C, 1000 lx 光照下, 经 5~7 d 含 PVY 的接种叶片出现黑色环斑。试验所用抗血清和酶标抗体均由黑龙江省农科院克山分院马铃薯病毒室提供。

1.2.3 抗性调查及调查标准

根据生物学和血清学检测的结果, 依据国际马铃薯中心 PVY 病级的分级标准(表 2、表 3, 由中国农业科学院蔬菜研究所冯兰香老师提供), 对鉴定材料进行抗性鉴定。

表 2 PVY 病级的分级标准

病级	发 病 情 况
0	无任何病症。
1	心叶明脉或轻花叶。
3	上部叶片轻花叶, 有时叶脉或叶柄或茎上产生坏死。
5	上中部叶片重花叶, 有的叶脉、叶柄或茎产生坏死; 个别叶片变小、变脆并皱缩。
7	多数叶片重花叶, 有的叶脉、叶柄或茎产生较多坏死斑; 少数叶片变小、变脆并皱缩或落叶, 植株稍矮化。
9	重花叶, 有的叶脉或叶柄或茎产生坏死较严重; 多数叶片变小、变脆并皱缩, 或植株明显矮化、落叶, 甚至死亡。

病情指数公式:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{每个病级的植株数} \times \text{级别数})}{(\text{调查总植株数} \times \text{级别数最高})} \times 100$$

表 3 马铃薯抗 PVY 的群体抗性分级标准

分 级 标 准	不侵染, 病情指数=0	0<病情指数 ≤5	5<病情指数 ≤20	20<病情指数 ≤35	35<病情指数 ≤60	60<病情指数 ≤100
抗性类型	免疫 (I)	高抗 (HR)	抗病 (R)	中抗 (MR)	感病 (S)	高感 (HS)

2 结果与分析

2.1 检测结果

选取接种后无症状的健康植株和仅接种叶有轻微坏死条斑或花叶的植株进行了双抗体酶联免疫(DAS-ELISA)检测, 对于剩余的植株(症状较严重的)回接到马铃薯品种 A6 上, 采用了离体接种法, 检测结果见表 4 和图 1。

对各组合中发病症状较重的植株回接到 A6 上, 各个组合的病株率都为 100%, 说明这些症状是由接种的 PVY 病毒引起的, 并且根据接种后的发病症状, 进行抗 PVY 材料的筛选还是比较准确的。

表 4 5 个群体 PVY 检测结果

群体编号	植株回接于 A ₀ 上的测试结果			ELISA 检测结果		
	接种株数	感病株数	病株率	检测数	感病株数	病株率 %
(103)	51	51	100	39	27	69.2
(104)	51	51	100	58	13	22.4
(105)	51	51	100	54	9	16.7
(101)	51	51	100	5	5	100
(102)	51	51	100	8	2	25.0

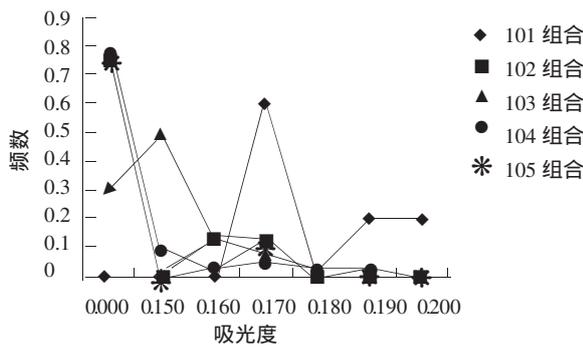


图 1 PVY 病毒 ELISA 检测吸光度频数分布

图 1 反应了各组合中无症状或症状轻微植株

的 ELISA 检测结果。图中横坐标表示吸光值为 0, 后面依次表示 $0.15 \leq \text{吸光值} < 0.16$, $0.16 \leq \text{吸光值} < 0.17$, $0.17 \leq \text{吸光值} < 0.18$, $0.18 \leq \text{吸光值} < 0.19$, $0.19 \leq \text{吸光值} < 0.2$ 。在 ELISA 检测结果中, 两板阴性对照的吸光度值都为 0, 因此吸光度值为 0 的为阴性, 超过 0 的为阳性。阳性对照的吸光度值分别为 2.465 和 2.080。在图中, 102、104 和 105 组合的阴性植株频数都在 70% 以上, 所鉴定植株最大的吸光度值也 > 0.200 , 远远低于阳性对照的值, 再次说明根据接种后的发病症状, 进行抗 PVY 材料的筛选是比较准确的。并且证明了鉴定材料中不存在耐病毒性材料。

2.2 抗性鉴定和抗 PVY 材料的筛选

根据发病症状和以上的检测结果, 按照国际马铃薯中心 PVY 病级标准, 在第二次接种 21 d 后, 对鉴定材料进行了抗性分级。具体结果见表 5。

从表 5 中我们看到, 各组合对马铃薯 Y 病毒的抗性存在差异。S. stoloniferum(S.A2)×S. stenotomum (104 群体) 和 S. stoloniferum(S.A5)×S. stenotomum (105 群体) 群体都属于抗病, 但与其同父本的 S. chacoense×S. stenotomum(103) 群体确为中抗, 说明 S. stoloniferum (S.A2) 和 S.stoloniferum (S.A5) 对 PVY 具有抗性。而本试验中恰柯薯 S. chacoense

表 5 抗性鉴定结果

鉴定群体	鉴定群 体株数	0 级		1 级		3 级		5 级		7 级		9 级		发病 率	病情 指数	群体 抗性
		株数	(%)													
101	45	0	0	5	11	31	69	8	18	1	2	0	0	100	36	S
102	81	6	7	2	2	14	17	51	63	7	9	1	1	93	50	S
103	90	12	13	27	30	36	40	9	10	3	3	3	3	87	29	MR
104	69	45	65	13	19	8	12	2	3	1	1	0	0	35	9	R
105	66	45	68	9	14	5	8	7	11	0	0	0	0	32	10	R
Σ	351	108	31	56	16	94	27	77	22	12	3	4	1			

注: 群体抗性中 R 为抗病, MR 为中抗, S 为感病。

(102) 和落果薯 S. demissum(101) 群体表现为感病。

在 351 份材料中我们筛选出有 108 份 0 级抗性植株, 56 份 1 级抗性植株, 其中 104 和 105 入选率最高, 其次为 103 组合, 101 组合没有植株入选。但 101 组合 69% 的植株表现 3 级抗性, 全部

材料中 3 级抗性材料共筛选出 94 株。

3 讨论

本研究的主要目的是评价这些马铃薯野生种材料的抗 PVY 水平, 抗性筛选表明这 5 个群体中的

大部分材料对 PVY 有一定的抗性。从 351 份材料的抗 PVY 等级分类结果可以看出, 有 *S. stoloniferum* 血缘关系的群体(104 和 105)入选率最高, 0 级抗性植株百分比都在 65% 及以上, 其次是有 *S. chacoense* 血缘的群体(103), 0 级材料 12 份, 1 级材料 27 份, 3 级材料 36 份, 再次之是 *S. chacoense* ×(102) 群体, 0 级材料只有 6 份, 而 *S. demissum* ×(102) 群体没有 0 级抗性植株入选, 1 级的也只有 5 株。据报道 *S. stoloniferum* 主要用作对 PVY 免疫的亲本, 国外利用该野生种育成了抗 PVY 的品种, 如 Wega 等^[5], 这一点与本文结果相符。而从 *S. chacoense* 和 *S. demissum* 中能分离出抗 PVY 的类型, 本试验中虽然也从中筛选出了抗 PVY 的植株, 但数量较少, 并且它们的群体抗性较差, 可能是进行鉴定的这两个群体样本量太少, 并且它们中刚好抗 PVY 的植株比例又较少, 因此并没有反映出这两个种在抗 PVY 上的优势^[5]。当然任何抗病性鉴定都需要多年的试验来进行筛选, 所以对本试验中初步筛选出的抗性材料, 今后应该对其进一步进行田间鉴定和筛选。

野生种的资源是相当丰富的, 将野生种的有利基因转育到栽培种中, 克服普通栽培种基因狭窄问题, 具有重要意义。Stegemann 和 Schnick^[6]研究了 20 个欧洲国家的 508 个品种的亲缘关系, 发现

80% 的品种中有野生种和原始栽培种的血缘。美国推广的品种 1/3 参与了野生种种质。尽管如此, 目前仍有许多资源未被挖掘, 即使已经收集到的资源也未被育种者全面认识和利用, 在育种上利用的野生种仅是极少部分^[2], 在育种上利用的野生种仅是极少的部分。因此, 今后我们应该对野生种进行更多的研究, 使其为马铃薯育种工作做出更多的贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Hooker W J. 马铃薯病害及其防治 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992.
- [2] 孙慧生. 马铃薯育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [3] Matanabe K, Orrillo M, Iwanaga M, et al. Diploid potato germ-plasm derived from wild and land race genetic resources [J]. American Journal of Potato Research, 1994, 71: 599-604.
- [4] 李克莱. 马铃薯野生种和原始栽培种在现代马铃薯育种利用的研究进展[J]. 内蒙古大学学报, 1994, 25(3):333-339.
- [5] Webb R E, Schultz E S. Resistance of *Solanum* species to potato viruses A, X, and Y[J]. American Journal of Potato Research, 1961, 38: 137-142.
- [6] Stegemann H, Schnick D. Index 1985 of European potato varieties [M]. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 227. Berlin Hamburg: Parey, 1985.

Resistance Identification and Screening of Wild Potato Resource to Potato Y Virus

Huang Meijie¹, Mao Yanzhi², Sheng Wanmin², Chen Yili¹

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;
2. Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China)

Abstract: Through artificial inoculation, 5 wild potato populations were evaluated and screened for resistance to potato virus Y (PVY). There was apparent difference in resistance to PVY in the five wild potato populations. *Solanum stoloniferum* (S.A2) × *S. stenotomum* (the population 104) and *S. stoloniferum* (S.A5) × *S. stenotomum* (the population 105) were resistant to PVY, *S. chacoense* × *S. stenotomum* (the 103 population) was moderately resistant to PVY, and *S. chacoense* × (the 102 population) and *S. demissum* × (101) were susceptible to PVY. Some resistant genotypes were selected out from these five populations, i.e. 108 genotypes in grade 0, 56 genotypes in grade 1, and 94 genotypes in grade 3, which may be used as parents in potato resistant breeding to PVY.

Key Words: wild potato; potato virus Y; resistance identification; resistance screening